

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE MONTPELLIER SUPAGRO

En Ecophysiologie et Adaptation des Plantes

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau
Portée par l'Université de Montpellier

Unité de recherche IPME

La bonne santé de la plante peut-elle limiter l'incidence des maladies : étude du couple *Coffea arabica* et *Hemileia vastatrix*

Présentée par Lucile TONIUTTI
le 05 décembre 2017

Sous la direction de Benoît BERTRAND
et Jean-Christophe BREITLER

Devant le jury composé de

Véronique DECROOCQ, Directeur de recherche, INRA Bordeaux
Laurent LEGENDRE, Professeur, Université Lyon 1
Marc BARDIN, Directeur de recherche, INRA Avignon
Pierre CZERNIC, Professeur, Université de Montpellier
Lydie GUILIONI, Ingénieur de recherche HDR, Montpellier SupAgro
Juan-Carlos HERRERA PINILLA, Chef de projet, Nestlé

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Président du jury
Examineur
Invité

« Le paradoxe de la science est qu'il n'y a qu'une réponse à ses méfaits et à ses périls : encore plus de science. » Romain Gary

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : Madame Véronique Decroocq et Monsieur Laurent Legendre, rapporteurs de cette thèse, Monsieur Marc Bardin, Monsieur pierre Czernic et Madame Lydie Guillioni examinateurs de cette thèse, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci de l'intérêt que vous portez à ce travail. Merci par avance pour vos remarques et suggestions qui feront avancer les questionnements sur ce sujet.

Merci au centre de recherche et développement Nestlé Tours, et en particulier à Charles Lambot, Isabelle Privat et Juan-Carlos Herrera pour m'avoir accordé leur confiance puis soutenu dans ce projet ambitieux. Merci de m'avoir ainsi permis d'approcher le monde de la recherche dans un grand groupe international comme Nestlé. Etre au cœur d'un partenariat public-privé fut très enrichissant. Un merci tout particulier à Juan Carlos pour sa gentillesse et son aide précieuse sur la partie essai en phytotron grâce à son expertise sur la rouille.

Merci également aux membres de mon comité de thèse, Jawad Aarouf, Laurent Urban, Anne-Sophie Petitot et Diana Fernandez, de m'avoir guidée et prodigué leurs conseils à des étapes importantes de ma thèse.

Merci à Valérie Verdier pour son accueil au sein de l'UMR IPME.

Un immense merci à mes deux directeurs de thèse : Benoît Bertrand et Jean-Christophe Breitler. Merci pour votre encadrement, votre aide et votre disponibilité notamment pendant la période de rédaction.

Benoît, merci pour tout le temps que tu m'as consacré malgré tes nombreuses charges. Merci de m'avoir transmis un peu de ton incroyable savoir sur la filière café, ses enjeux et ses problématiques. Merci de m'avoir fait partager ta passion pour le métier de sélectionneur café.

Merci Jean-Christophe pour ton aide lors de l'essai ambitieux en phytotron. Merci pour tes conseils, ton optimisme, tes encouragements. Je n'oublierai pas les nuits de veille à la serre sur les sacs de terreau et les bons moments lors de la mission en Colombie.

Merci à l'équipe CoffeeAdapt et particulièrement à Hervé Etienne pour son accueil au sein de l'équipe et son aide. Merci Hervé pour nos longues discussions et ton optimisme à toute épreuve. Merci Claudine et Eveline pour votre aide lors des expérimentations. Merci à Sophie et Hervé d'avoir relu mon manuscrit de thèse.

Isabelle Herault, merci pour ton extrême disponibilité, ton efficacité et ta gentillesse. Les tâches administratives deviennent tellement simples avec toi. Un grand merci !

Merci aux deux stagiaires que j'ai pu encadrer : Charlie et Doaâ pour votre travail et votre leur sympathie.

Merci à Lionel Gagnevin pour ses conseils avisés de phytopathologiste !

Merci à Andres Mauricio pour son accueil très chaleureux à CENICAFE en Colombie.

Merci aux serristes du CIRAD : Christian, Rémy, Eve et Semi pour leur bonne humeur, leurs fous rires communicatifs, leur incroyable gentillesse et leur aide précieuse lors de l'essai en phytotron. Un grand merci notamment pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la tâche fastidieuse du comptage de spores de rouilles.

Myriam et Sylvie, Un grand merci pour vos bêtises, vos petites attentions, votre éternelle bonne humeur. Une mention particulière pour la pêche aux poissons et les petites pauses thé-gâteaux. Sylvie, merci également pour ton aide lors de la manip amidon.

Merci à tous les anciens du bureau des doctorants de la zone 5 où il a régné une ambiance tout à la fois studieuse, et joyeuse, faite d'amitié, de solidarité, de rires et de

« craquages » ! Merci à la maman du bureau des doctorants : Agnès ! Merci pour tes conseils, ta bienveillance et pour nos discussions matinales. Merci Hinda pour ton rire communicatif et ton partage sur le Mali ; Maïra pour l'ambiance et la nourriture brésilienne, Céline pour ton humour décapant, pour nos discussions sans queue ni tête et nos « pétages de plombs » bières, Mathilde H merci pour m'avoir changé les idées par tes nombreux « j'ai un truc à te raconter » et pour ton soutien actuel même à distance ! Merci à Tu et Bear pour le partage de votre culture, les craquages lorsque 20h s'approche et les discussions improbables ! Merci Taca et Carolina pour les discussions et fou rires !

Merci à ceux qui ont transité dans mon bureau actuel : merci Ialy pour nos batailles de clim, ton brin de folie, ta bonne humeur constante et tes phrases chocs ; merci Ehogan l'homme qui parle et chante tout seul pour tes « râleries », pour ta patience d'avoir supporté mes humeurs de troisième année. Merci encore à Maïra et Daisy pour l'ambiance brésilienne qu'elles propagent dans le bureau ainsi que pour le petit coin de nourriture toujours utile en cas de stress intense.

Merci à toute la bande des doctorants de l'IRD pour les bons moments, nombreuses soirées et les week-ends dans les alpes, à Nice, au skiMerci à Mathieu pour les douceurs vietnamiennes et les discussions matinales ; à Jeremy pour le dépannage de batterie au pied levé, à Hélène pour les discussions banane d'or. Merci Cécile pour ton positivisme et tes ateliers courses fitness et bracelets brésiliens. Merci à Chloé pour les bières, les redondances et les déjeuners au CIRAD. Merci Emilie, la petite chauve-souris dotée d'une gentillesse sans limite pour les « remontages » de moral, pour ton aide quand tu sentais que je n'allais pas finir la manip avant la fermeture ainsi que pour ton aide lors du fastidieux grattage de rouille ! Merci Mathilde D pour tes conseils KGB et les bons moments passés en Chine et en Belgique. Merci Rémi pour nos pauses quotidiennes nous permettant de nous évader un peu en parlant de tout et de rien, pour le sauvetage de mon ordinateur après une attaque de ransomware, pour ta gentillesse, ton soutien, tes « allez » caractéristiques et surtout ton aide sur R ! Merci Fabien pour les soirées sympathiques. Merci Sinara pour les chansons brésiliennes et ta bonne humeur.

Merci à notre post doc préférée Maryline pour les bières et notre amour partagé du café.

Enfin, merci Alexandre Grondin pour tes conseils avisés et tes paroles rassurantes, merci Kevin pour les discussions rapides dans les couloirs, Gilles pour ton humour belge. Merci Cyril pour la touche réunionnaise que tu as apportée au labo pendant 6 mois, pour les discussions matinales quotidiennes et les proverbes chinois forts utiles en dernière année.

Merci aux hommes et femmes de ménages de l'IRD de leur grande gentillesse, merci pour leur délicatesse qui allait jusqu'à passer l'aspirateur autour du sac de biblio en prenant soin de ne rien bouger lorsque j'oubliai de libérer le sol.

Merci à Florian Potier, le gardien, de m'avoir permis de récupérer mon chargeur d'ordinateur un dimanche.

Un grand Merci à tous pour ces moments de partage qui ont agrémenté mon parcours de doctorante.

Valorisation

Article publié

Campa, C. et al. (2017) 'Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase', *Frontiers in Plant Science*, 8(July), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.01126.

Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doulebeau S, Dechamp E, Lambot C, Herrera Pinilla JC, Bertrand B. (2017) 'Influence of Environmental Conditions and Genetic Background of Arabica Coffee (*C. arabica* L) on Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Pathogenesis' *Frontiers in Plant Science*

Communication orale

Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doulebeau S, Dechamp E, Lambot C, Herrera Pinilla JC, Bertrand B. Impact of environmental conditions on plant health and leaf rust incidence in *Coffea arabica*. 26th ASIC International Conference on Coffee Science, Kunming (China) November 13-19 2016

Communication sur affiche

Toniutti L, Breitler JC, Etienne H, Campa C, Doulebeau S, Dechamp E, Lambot C, Herrera-Pinilla JC, Bertrand B. Impact of environmental conditions on plant health and leaf rust incidence in *Coffea arabica*. 26th ASIC International Conference on Coffee Science, Kunming (China) November 13-19 2016

Toniutti L, Lambot C, Herrera-Pinilla JC, Breitler JC, Bertrand B. Does physiological state limit rust incidence? Deciphering the 'plant x environment' molecular interactions in *Coffea arabica*. TSL Norwich (UK) August 2015

Partie 1. Introduction	12
1.1 La santé des plantes ; un enjeu majeur pour celle de l'homme ?	13
1.1.1 Un concept au cœur de multiples controverses	15
1.1.2 Impact de l'environnement sur la santé de la plante	23
1.1.3 Influence génotypique sur la santé de la plante	34
1.1.4 Comment mesurer l'état de santé de la plante : cas de l'efficience photosynthétique	42
1.2 Présentation du modèle d'étude hôte-parasite : le couple <i>H. vastatrix</i> / <i>C. arabica</i>	46
1.2.1 Le modèle café	46
1.2.2 La rouille orangée	52
1.3 Approches et objectifs du projet de thèse	64
Partie 2. Influence des conditions environnementales et du fond génétique de <i>Coffea arabica</i> sur la pathogénèse d' <i>Hemileia vastatrix</i>	67
2.1 Contexte	68
2.2 Stratégie	69
2.3 Conclusions	71
2.4 Article	72
2.4.1 Abstract	72
2.4.2 Introduction	73
2.4.3 Materials and methods	76
2.4.4 Results and discussion	82
2.4.5 Conclusions	93
2.4.6 Acknowledgements	94
2.4.7 Contribution	94
Partie 3. Etude du déterminisme moléculaire de la meilleure performance agronomique d'un clone d'hybride F1 de <i>Coffea arabica</i> via une approche de transcriptomique.	95
3.1 Contexte	96
3.2 Stratégie	97
3.3 Conclusions	98
3.4 Article	99
3.4.1 Abstract	99
3.4.2 Introduction	100
3.4.3 Material and method	103
3.4.4 Results	109
3.4.5 Discussion	122
3.4.6 Supporting information	127

Partie 4. Etude du transcriptome de variétés hybrides d'Arabica au cours de l'infection par la rouille orangée	133
4.1 Contexte	134
4.2 Stratégie.....	135
4.3 Conclusions	136
4.4 Article.....	137
4.4.1 Introduction.....	137
4.4.2 Matériel et Méthodes	139
4.4.3 Résultats et discussion	144
4.4.4 Conclusions et perspectives	157
4.4.5 Annexes.....	161
Partie 5. Discussion.....	162
5.1 Quel rôle joue l'environnement et les pratiques agricoles sur l'infection et la capacité de réponse de la plante ?	164
5.2 Quelle est la capacité du caféier à croître sous des conditions de stress multiples incluant la rouille orangée ?	166
5.3 Quelle est la relation entre la vigueur hybride, l'efficacité photosynthétique et plus généralement le métabolisme énergétique ?	169
5.4 Comment identifier des gènes candidats de la bonne santé et/ou de la résistance basale?	170
5.5 Comment interpréter la meilleure performance des hybrides par l'expression des gènes candidats liés à la réponse aux stress ?.....	172
5.6 Comment renforcer l'hypothèse de la meilleure résistance des hybrides par l'état initial de santé de la plante ?	174
5.7 Comprendre les bases moléculaires de la santé de la plante	175
5.8 Utiliser l'environnement comme une source de variation pour identifier des QTT (Quantitative Traits Transcripts) liés à la santé de la plante.....	176
Partie 6. Bibliographie	177
Partie 7. Annexes	192

Table des figures

Fig. 1: La canalisation de l'énergie est transférée de la production de biomasse aux programmes de défense.	23
Fig. 2: Mécanismes de régulation du compromis entre croissance, défense contre un pathogène et attaque par un herbivore :	33
Fig. 3: Modèle expliquant la synthèse accrue d'acide salicylique chez les hybrides.....	40
Fig. 4: Présentation du Handy PEA.	43
Fig. 5: Représentation schématique de la principale voie de l'énergie en lien avec la fluorescence de la chlorophylle a.	44
Fig. 6: Formation de l'allotétraploïde <i>C. arabica</i>	49
Fig. 7: Symptômes causés par la rouille orangée sur <i>C. arabica</i>	52
Fig. 8: Processus d'infection d' <i>Hemileia vastatrix</i>	54
Fig. 9: Principes de l'immunité chez les plantes.	58
Fig. 10: Symptôme d'hypersensibilité sur la variété résistante Marsellesa de <i>C. arabica</i>	59
Fig. 11: Arabica coffee plants infected by <i>H.vastatrix</i>	82
Fig. 12: Comparison of two thermal regimes in the inbred line Caturra with different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation 43 days post <i>H.vastatrix</i> inoculation.	83
Fig. 13: Variations in the percentage of leaves infected by <i>H.vastatrix</i> during the time course of the infection under different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation in three different genotypes.	85
Fig. 14: Quantity of rust per infected leaf area (also named 'sporulation') produced by <i>H.vastatrix</i> under different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation in three different genotypes.....	86
Fig. 15: Correlation between parameters derived from Chlorophyll a fluorescence induction curve and quantity of rust harvested on three <i>Coffea arabica</i> genotypes grown with different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation under TR (27-22° C).	90
Fig. 16 Comparison of agronomic performance in two different genotypes	109
Fig. 17 : Daily expression of the central clock genes.	110
Fig. 18 Altered expression patterns of circadian clock genes in the F1 hybrid during the day.	111
Fig. 19 : Heat map of circadian clock, photosynthesis and chlorophyll metabolism genes correlations.	112
Fig. 20 Regulation of the chlorophyll biosynthetic and catabolic pathways in two different <i>C. arabica</i> genotypes.	115
Fig. 21 Study of total performance index in two different <i>C. arabica</i> genotypes.....	117
Fig. 22 : Altered photosynthetic carbon metabolism in F1 hybrid.	120
Fig. 23: Corrélacion entre la quantité de rouille 43 jours après infestation et l'indicateur de la quantité de rouille 7 jours après infestation pour la variété lignée Caturra.....	140
Fig. 24: Développement de deux algorithmes permettant de détecter des gènes candidats.	142
Fig. 25: Distribution des valeurs de Score de Fisher calculées avec l'algorithme 1	145
Fig. 26: Diagramme de Venn des listes de gènes issues des algorithmes 1 et 2.	146
Fig. 27: Classification hiérarchique de l'expression à 48h des gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 1.	147
Fig. 28: Classification hiérarchique de l'expression 7 jours après infestation des gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 2.	149
Fig. 29: Enrichissement GO des différents profils d'expression.....	150

Fig. 30: Expression du gène Cc05_g09930 au cours de la cinétique pour 3 géotypes et deux environnements.....	154
Fig. 31: Expression du gène Cc07_g10030 au cours de la cinétique pour 3 géotypes et deux environnements.	155
Fig. 32: Expression des gènes Cc08_g07850 et Cc02_g33780 au cours de la cinétique pour 3 géotypes et deux environnements..	156

Préambule

Même si la caféiculture n'est pas une culture vivrière, les revenus de millions de personnes et la balance commerciale de nombreux pays du sud dépendent des exportations de café vers les pays consommateurs du nord (Ponte, 2002). Deux principales maladies limitent la production : la rouille orangée et l'anthracnose des fruits (Herrera. *et al.*, 2008). La rouille orangée, présente dans presque tous les pays producteurs de café (Rozo *et al.*, 2012), est considérée comme la maladie la plus dévastatrice pour cette culture (Romero *et al.*, 2014). Elle est causée par le basydiomycète, *Hemileia vastatrix*, un parasite obligatoire qui attaque les feuilles du caféier et peut entraîner de fortes défoliations lors de la phase de remplissage du grain, entraînant des pertes de rendement conséquentes.

De 2008 à 2013 une vague d'épidémies de rouille orangée sévit en Mésio-Amérique de la Colombie au Mexique incluant le Pérou, l'Equateur et quelques pays des caraïbes (Avelino *et al.*, 2015). L'incidence de la maladie est passée de moins de 5 % avant 2008 à plus de 40 % en Colombie (Rozo *et al.*, 2012) et a causé une diminution marquée de la production de café d'en moyenne 31% et 16% en Colombie et en Amérique centrale respectivement. Ces épidémies ont eu un très fort impact social et ont conduit à d'importants problèmes de sécurité alimentaire (Avelino *et al.*, 2015). Trouver une solution durable permettant de lutter contre *H. vastatrix* devient un axe prioritaire. En revanche, la résistance spécifique basée sur des mécanismes de résistance gène pour gène est progressivement contournée et s'avère peu durable. En début d'année une nouvelle crise a secoué le monde du café quand le Honduras a annoncé que la variété Lempira (Catimor) pourtant récemment créé n'était plus considérée comme résistante après le contournement de ses résistances par *H. vastatrix*.

Par ailleurs, le changement récent des conditions météorologiques a eu un fort impact sur ces épidémies. Il les favorise en agissant sur deux leviers: le développement du pathogène mais également en modifiant l'état physiologique de la plante par le biais de stress. Dans le contexte actuel du réchauffement climatique, les épidémies de rouille orangée devraient être plus intenses et plus fréquentes dans le futur, faisant de la recherche de solutions permettant de limiter l'incidence de la rouille une priorité de la filière café. Une caféiculture basée sur des techniques culturales adaptées et le choix de variétés sensibles mais suffisamment vigoureuses pour limiter la sévérité des attaques de rouille apparaît comme une alternative prometteuse.

En effet, une étude préliminaire sur le caféier a montré que le ratio ‘feuille : fruit’ est un facteur déterminant qui limite l’incidence de la maladie.

Ce travail de thèse s’inscrit dans cette thématique et vise à comprendre comment les facteurs génotypiques et environnementaux, en impactant l’état de santé du caféier, influent sur l’incidence de la rouille, puis à comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Dans la première partie du manuscrit, nous proposons une synthèse bibliographique visant à apporter les connaissances générales sur le concept de santé des plantes et l’application de ce concept dans la lutte contre *H.vastatrix* chez *C. arabica*. Elle permettra de présenter nos principales hypothèses de travail détaillées par la suite au sein de trois chapitres.

La partie 2 présentera l’influence des conditions environnementales et du fond génétique de *C. arabica* sur la pathogénèse d’*H.vastatrix*. La partie 3 permettra de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à la meilleure performance agronomique d’un hybride F1 de *C. arabica*. La partie 4 s’articulera sur la recherche de gènes candidats qui pourraient expliquer une moindre sensibilité des hybrides F1 par rapport à la lignée par le développement d’un algorithme original. Enfin, la dernière partie fera l’objet d’une discussion sur l’ensemble des résultats obtenus et conclura sur les perspectives ouvertes par nos travaux.

Partie 1. Introduction

1.1 La santé des plantes ; un enjeu majeur pour celle de l'homme ?

Maintenir un couvert végétal non seulement dense mais sain à la surface du globe est une nécessité pour l'avenir de l'humanité. Il y a 10 000 ans, l'Homme cessant d'être seulement un prédateur, a développé l'agriculture et est devenu un producteur qui renouvelle ce qu'il consomme par les semis et l'élevage. Entre 9500 et 7500 av. J.-C. les groupes humains se sédentarisent et l'agriculture se développe avant de se banaliser pour permettre le développement des civilisations urbaines. Ces deux phénomènes ont révolutionné les habitudes de l'espèce humaine et sont à l'origine de conséquences incalculables. La maîtrise des végétaux et des animaux (élevage) a permis un accroissement démographique sans précédent et le développement fulgurant de l'industrie à partir du 18^{ème} siècle.

Après 10 000 ans de sédentarisation, d'agriculture, et d'industrialisation, l'homme a modifié profondément les écosystèmes. Aujourd'hui, la population mondiale continue de s'accroître, ce qui entraîne une demande importante de terre, alors qu'on se dirige inéluctablement vers les limites physiques de la planète. Partout la pression sur les écosystèmes naturels se fait de plus en plus forte pour aboutir dans certains cas à des modifications irréversibles. Une disparition de la faune aux conséquences 'catastrophiques' pour les écosystèmes et aux impacts écologiques, économiques et sociaux majeurs est en cours et s'accélère (Ceballos, Ehrlich et Dirzo, 2017). Il n'est plus contesté que l'agriculture participe à la destruction des écosystèmes. Alors même qu'elle subit les effets du changement climatique (sécheresses, inondations, hausses des températures) elle y contribue également fortement: 24% des gaz à effet de serre sont produits par l'agriculture (Torquebiau, 2015). Nos modèles agricoles doivent donc être repensés de manière urgente. Cette nécessité d'innover n'est pas nouvelle et a déjà été vécue dans l'Histoire. Ce qui est nouveau c'est que ce processus se joue maintenant à l'échelle planétaire sur toutes les cultures à la fois (Griffon, 2010).

Les défis à relever sont énormes : comment conserver la biodiversité, comment conserver des couverts végétaux abondants et sains (en particulier dans les zones tropicales), comment nourrir l'humanité avec une nourriture saine et abondante ? Hier la réponse était simple, il suffisait d'augmenter les rendements, et la recette était connue: 'la Révolution Verte' qui consistait à accroître l'utilisation intensive des fertilisants et des pesticides et la mécanisation.

Le ‘parapluie phytosanitaire’ était une réponse industrielle et universelle qui permettait d’assurer des rendements stables et élevés. Or il est maintenant bien établi que l’agriculture intensive entraîne des effets environnementaux négatifs (excès d’engrais, pollution des nappes, perte de biodiversité, etc..) et présente des risques notables pour la santé humaine des producteurs et des consommateurs.

‘La santé des plantes est d’importance vitale pour tout le monde’ (Lucas, 2009). On sait en effet que la photosynthèse est probablement le processus biochimique le plus important sur terre. Les molécules d’oxygène rejetées par les végétaux dans l’atmosphère enrichissent constamment l’air que nous respirons. Les végétaux, avec les bactéries, sont les seuls êtres vivants capables de produire des substances organiques avec des éléments minéraux. De ce fait ils constituent le premier maillon d’une chaîne dont dépend le règne animal. Les plantes assurent un lien indispensable entre le monde organique et inorganique.

Une bonne santé ‘naturelle’ des végétaux sauvages ou cultivés est-il un indicateur d’un écosystème équilibré et sain pour l’homme ? Dans une agriculture idéale, il s’agit en tout cas d’un objectif et la discipline qui s’y intéresse s’appelle la ‘protection des végétaux’. Encore faut-il que cette bonne santé ne soit pas qu’apparente, c’est-à-dire obtenue par l’usage intensif de pesticides. Pour faire face à ce problème, en 2016, une étude commandée par le ministère de l’agriculture Français a conclu que les externalités de l’agriculture biologique étaient positives en termes de santé publique (<https://reporterre.net/Une-etude-scientifique-conclut-aux-effets-benefiques-globaux-de-l-agriculture>).

Cependant, les rendements dans l’agriculture biologique sont en général plus faibles que ceux obtenus dans l’agriculture intensive. Baser la mutation des agricultures sur une agriculture peu intensive ne peut toujours pas permettre de répondre aux grands défis modernes. En milieu tropical l’agroforesterie qui est une pratique agricole reconnue comme particulièrement adaptée à la conservation des sols et de la biodiversité, occasionne des pertes de rendement de 30% et la pression de certains pathogènes sur les plantes cultivées (Avelino *et al.*, 2015). Laisser se développer certaines maladies bactériennes ou fongiques par manque de traitement peut aussi avoir des conséquences négatives en termes de santé publique (<https://www.anses.fr/fr/content/le-point-sur-les-mycotoxines>).

Pour faire évoluer l’agriculture, Il faut promouvoir l’Agriculture Ecologiquement Intensive (Griffon, 2011) (Ecologically Intensive Agriculture). Dans ce nouveau paradigme il faut entre autres choses, revisiter l’équation classique « variétés sensibles + parapluie

phytosanitaire » pour essayer de lui substituer l'équation « variétés résistantes et/ou adaptées + fertilisants naturels + bonne santé de la plante » tout en maintenant un objectif de rendement équivalent. Le concept de 'santé de la plante' mérite d'être bien défini et c'est ce que nous nous efforcerons de faire dans la première partie de notre exposé.

1.1.1 Un concept au cœur de multiples controverses

L'idée, qui paraît simple, reviendrait à dire qu'une plante en bonne santé est : i) une plante qui n'est pas malade, ii) une plante qui ne tombe pas malade, iii) une plante qui se relève plus vite de la maladie (résiliente). Mais est-ce si simple que cela et que recouvre réellement ce concept de 'santé de la plante' ?

Le terme « Santé des Plantes » a deux acceptions. Premièrement, il se réfère à un cadre administratif et normatif pour juger de la santé des plantes inspectées par des autorités sanitaires dans le cadre de la délivrance de permis d'importer ou d'exporter pour le passage aux frontières. La deuxième acception qui nous intéresse est discutée ici. Elle concerne tous les aspects liés à la santé de l'organisme et à sa protection. Ce paragraphe s'inspire de l'article de Döring *et al.* (2012) qui fait une revue exhaustive des différents points de vue sur ce sujet.

1.1.1.1 Les différents points de vue sur la Santé de la Plante

La santé humaine a fait l'objet de multiples débats et constitue le point de départ pour comprendre ce qu'est une plante en bonne santé. Malgré de nombreux points qui diffèrent entre l'homme et la plante : i) une plante malade ne pose pas un problème éthique, ii) les plantes représentent des espèces très différentes, (quelquefois en compétition) pour lesquelles l'état de 'bonne santé' diffère. iii) les plantes sont rarement soignées (et encore moins guéries) par les soins des hommes, il s'agit plutôt de prévention ; iv) les plantes ne semblent pas consciemment souffrir des maladies.

Malgré tous ces points de différence, le concept de Santé Humaine est opérationnel sous certains aspects quand il s'agit d'aborder celui de la santé des plantes. En effet : i) la santé des plantes (et des hommes) varie en fonction de l'âge et des individus ii) l'état de santé est dynamique, il varie au cours du temps iii) la santé varie en fonction des pathogènes auxquels sont soumis les individus iv) les pathogènes peuvent développer des résistances aux traitements.

1.1.1.1.1 L'approche naturaliste vs l'approche normative pour définir la santé

Le débat sur la Santé humaine a été dominé par deux points de vue opposés qui ont été appelés 'naturalistes' vs 'normatifs'. Les 'naturalistes' pensent que la santé est d'origine naturelle et qu'elle est indépendante du regard des hommes. La Santé apparaît pour eux comme une catégorie objective qui peut être décrite par des mesures quantitatives et objectives. Dans le cas des plantes, la santé sera déterminée par des phytopathologistes, dans le cas des humains par les médecins.

A contrario, les 'normatifs' pensent que la Santé est relative et qu'elle dépend des valeurs humaines. Elle plutôt subjective. Par exemple en santé humaine, ils laissent une certaine liberté aux patients pour identifier ce qu'est la santé pour eux.

La définition 'naturaliste' se heurte à un problème de référence. Pour déclarer une plante en bonne santé, il faut pouvoir la comparer à une référence. On peut comme Boorse (1977) définir un groupe de référence sur la base de sa moyenne et de sa variance. Cette définition se heurte à certaines difficultés lorsqu'il s'agit d'une population d'individus d'âges et de sexe différents. Certains auteurs ont essayé de résoudre ce dilemme en disant qu'une 'plante est saine, ou normale, quand ses performances physiologiques, déterminées par son potentiel génétique et les conditions environnementales, sont maintenues [(Schlösser, 1997) in (Döring et al., 2012)]. Cependant l'évaluation d'un potentiel génétique et surtout des conditions environnementales renvoie à des difficultés majeures d'évaluation et de cadre de mesures.

A l'opposé, la construction 'normative' pose également de nombreux problèmes. Si pour les 'normatifs' les valeurs culturelles jouent un rôle essentiel, comment à l'extrême ne pas tomber dans le plus complet arbitraire. Le risque d'un tel relativisme est que la santé de la plante devient une suite d'opinions potentiellement contradictoires. D'autre part, contrairement aux hommes, les plantes ne savent pas dire si elles vont bien ou mal.

En définitive les deux approches présentent des failles conceptuelles. Lorsqu'il s'agira de prendre une décision collective s'agissant de la protection des plantes, l'approche naturaliste aura tendance à promouvoir un 'paquet technologique' pour lutter 'universellement' contre la maladie. Par exemple un traitement chimique de grande ampleur. En revanche, 'l'approche normative' tendra davantage vers un dialogue avec les parties prenantes au travers d'approches participatives.

1.1.1.1.2 Définir la Santé de la plante d'une façon positive ou négative

Le concept de 'santé négative' définit la santé comme l'absence de maladies. Une plante saine sera donc une plante sans maladies. Il s'agit d'une vision 'pathogénique'. Pour vendre les pesticides l'industrie phytosanitaire utilise le terme de santé dans cette acception ce qui implique qu'une plante est saine si elle est libre du pathogène spécifique pour lequel elle a été traitée. Beaucoup d'articles scientifiques utilisent ce terme de 'saine' pour des plantes 'non-inoculées' dans l'expérience qu'ils décrivent.

Cette définition de la santé par l'absence de maladies a régulièrement été critiquée. La 'Santé par l'absence de maladies' fait l'impasse sur les stress occasionnés par les insectes ou par les conditions environnementales.

A l'opposé, la santé peut être définie de façon positive. Agrios (2005) définit la santé des plantes comme la 'capacité de réaliser ses fonctions physiologiques au plus près de son potentiel génétique'. Cette définition ne fait référence à aucun aspect négatif. Des définitions plus larges ont été proposées. Schimitschek (1952) propose que la santé des individus implique que tous ses organes soient actifs sans aucune perturbation et qu'ils agissent en harmonie avec l'ensemble de l'individu en assurant sa reproduction. On peut définir ce qu'est l'harmonie ; par contre sa mesure est compliquée voire impossible. Comment se mettre d'accord sur ce qui est harmonieux ou ne l'est pas. On retombe dans la subjectivité, ce qui rend la définition de Schimitscheck problématique.

Antonovsky (1996) introduit le concept de 'salutogenesis' pour la santé humaine. Ce concept positiviste peut être appliqué aux plantes. L'auteur suggère qu'entre l'état sain et malade il existe un continuum et qu'il faut s'intéresser à tout le spectre du bien-être. Le passage d'un pôle à l'autre se fait par un mouvement. Plutôt que de mettre en avant les 'facteurs de risques' il faut se demander quels facteurs sont en mouvement pour rétablir l'état de santé initial.

Déclinés pour le règne végétal, trois aspects de ce concept peuvent être mis en avant : i) quels sont les facteurs fixés de résistance génétique aux pathogènes (et notamment quels facteurs génétiques de résistance induite), ii) quels sont les effets compensatoires observés après l'attaque par un pathogène. Dans beaucoup de cas en effet, on observe une dilution des pertes par le fait que la croissance de la plante fait plus que compenser les pertes occasionnées par le pathogène, iii) la perspective d'un mouvement vers une meilleure santé s'étend à plusieurs générations. Si dans une population, des plantes ont une meilleure capacité à faire

face aux stress biotiques et abiotiques, alors elles se reproduiront plus et transmettront plus efficacement leur patrimoine génétique. L'observation (i.e. la sélection) de plantes pendant plusieurs générations englobe les études du déplacement vers la santé de la population.

La posture 'salutogénique' est consubstantiellement reliée à une approche écologique de la protection des plantes. A contrario, la posture 'pathogénique' tendra à vouloir supprimer les maladies et aura plutôt tendance à se concentrer sur des solutions techniques et chimiques d'éradication.

1.1.1.1.3 Réductionnisme vs. Holisme

L'holisme et le réductionnisme s'opposent aussi dans le domaine de la santé des plantes. Les holistes raisonnent sur un tout, -un système-, quand les réductionnistes ont une approche analytique et raisonnent sur un nombre réduit de composants du système. Les holistes considèrent le système comme un tout et essaient de le comprendre à un haut niveau d'intégration quand les réductionnistes ont pour objectif de prédire le fonctionnement d'un système par le fonctionnement d'un nombre réduit de ses composants et ont l'ambition de transférer ce résultat à un autre système.

Dans le champ scientifique de la santé des plantes, les réductionnistes considèrent que la santé définie pour un individu est valable pour un autre individu. Les critères de la santé sont en nombre réduits et peuvent être définis par spécialité. Les réductionnistes placent les sciences dans un ordre hiérarchique -Physique, chimie, biologie- (Janich, 2002). Tous les phénomènes peuvent s'expliquer par un nombre réduit de lois. La vision réductionniste s'est imposée au 19^{ème} siècle. Elle a contribué à subdiviser les sciences naturelles en disciplines (virologie, entomologie, bactériologie, etc..).

La vision holistique de la santé des plantes se réfère i) à leur intégrité : une plante est en bonne santé si son intégrité n'est pas violée ii) la santé des plantes est une propriété complexe qui dépend des communautés de plantes et d'organismes vivant avec l'individu (ou l'espèce) considérée (Comeau, Langevin et Levesque, 2005). Transposée au sélectionneur, compte-tenu de la complexité de la mesure, l'appréciation de la santé dépendra de 'l'œil du sélectionneur'. Aujourd'hui cette approche prend une importance inattendue du fait du développement du concept et des outils du phytobiome (Beans, 2017). En utilisant la métagénomique, la métabiotique, etc.. les chercheurs ont pour ambition de i) pouvoir définir ce qui constituera un agrosystème sain, productif et durable. ii) de proposer une boîte à outils pour mesurer l'évolution de l'agrosystème. On est là dans une approche holistique.

La posture holistique est stimulante intellectuellement mais manque de clarté. Le risque est de ne pas pouvoir construire des relations de causes à effets claires et donc des résultats reproductibles.

Cependant il existe une convergence entre les deux approches. Balfour (1943) (*in* Döring *et al.* (2012)) propose ainsi que la santé du sol, de la plante et de l'homme soit une et indivisible. Balfour fait l'hypothèse que la santé est transférable du sol à la plante et de la plante aux animaux et à l'homme (Kelly et Bliss, 2009). Aujourd'hui, sans véritablement que cette assertion soit étayée, beaucoup de gens considèrent qu'il y a une interdépendance entre les trois groupes et encore plus en considérant les agrosystèmes.

La nutrition du sol, interfère sur celle de la plante qui elle-même interfère sur celles des animaux/humains.

1.1.1.1.4 La question de l'interférence : Fonctionnalité vs Résilience

Un fonctionnaliste considérera qu'une plante traitée et sans maladie est une plante saine. La posture de la résilience verra une plante temporairement saine et mettra en avant sa capacité à récupérer ou à maintenir ses fonctions face à un stress (biotique ou abiotique).

Si une plante pour maintenir son intégrité et/ou ses capacités physiologiques afin d'accomplir son cycle de vie (sa santé), ne peut pas se maintenir sans le recours aux pesticides, alors cette plante ne peut pas être considérée saine selon un courant de pensée écologique. Il semble en effet inévitable que la résilience soit une composante intrinsèque de la santé des plantes.

Cependant ne pas vouloir interférer en milieu agricole semble également peu réaliste. L'intervention raisonnée pour protéger la plante est consubstantielle de l'activité agricole.

1.1.1.1.5 Matérialisme vs Vitalisme

Une autre controverse relative à la santé est le débat entre les tenants du matérialisme et ceux du vitalisme.

Pour les matérialistes, tous les phénomènes peuvent s'expliquer en termes d'interactions. La plante ressemble à une machine (le terme 'machinerie cellulaire' est par exemple fréquemment utilisé) et la nature est une gigantesque horloge. Tout est explicable par des lois physiques, elles-mêmes décrites par les mathématiques. Les recherches dans le cadre de cette théorie portent sur les processus biochimiques liés aux processus de défense par des

approches génomiques, transcriptomiques et protéomiques de la plante entière ou de ses organes.

A l'opposé la théorie 'vitaliste' pense que la Vie vient d'une force appelée 'élan vital' qui ne peut être réduite à des interactions de la matière. Que les plantes bénéficient, comme les animaux (et donc les humains) de cette force vitale est une croyance qui connaît une certaine prospérité en ce début de siècle. Elle est perçue par le monde scientifique comme relevant de la pensée magique ou du domaine du religieux. Ce qui est admis scientifiquement c'est qu'il s'agit d'un concept non-mesurable et donc non-quantifiable car le lien entre ce qu'il est possible de mesurer avec les technologies actuelles et cet élan vital n'existe pas.

La théorie vitaliste n'est pas la seule qui s'oppose à l'approche matérialiste. Les interactions entre molécules et atomes peuvent donner naissance à des radiations qui sont très difficilement mesurables (exemple de la bioluminescence) mais qui sont néanmoins admises comme existantes et qui pourraient refléter l'état de santé de la plante comme il est maintenant admis comme outil en santé humaine pour déterminer des états inflammatoires ou oxydatifs (Ives *et al.*, 2014) qui sont la principale source d'émissions des photons.

1.1.1.1.6 Quel point de vue adopter : Biocentrisme vs. Anthropocentrisme ?

Le biocentrisme prétend que les plantes, comme tous les organismes, ont des intérêts et comme telles sont dignes de considérations éthiques en dehors de la présence ou de l'absence de l'humanité. La promotion de la santé de la plante se fait donc au bénéfice de la plante exclusivement.

Ce point de vue engendre immédiatement un problème majeur. Si les plantes ont un intérêt, qu'en-est-il des pathogènes qui les attaquent ? S'il faut conserver les plantes, il faut également conserver les pathogènes. La solution ne peut être que globale et il faut raisonner en terme de communautés. S'il faut promouvoir une espèce ou la santé d'une espèce, cela doit se faire en pesant les avantages et inconvénients pour les autres espèces. En l'absence de considération humaine l'évolution poursuivra ses tests aveugles. En définitive, la notion même de santé de la plante devient secondaire, voire disparaît dans ce cadre de lecture.

L'anthropocentrisme considère que la santé des plantes est bénéfique pour l'homme et son avenir. C'est à partir de plantes en bonne santé que l'humanité pourra faire face à ses besoins en nourriture, biofuel, médecine, etc.. Mais le lien entre la bonne santé de la plante et

les objectifs des hommes est-il si évident ? On peut convenir que les études sur ce sujet manquent singulièrement en dépit des assertions.

1.1.1.2 Un concept consensus

Pourquoi, alors que la frontière entre une plante malade et une plante saine est souvent difficile à tracer, est-il si facile d'imaginer une plante saine ? La plupart des gens imagine une plante dont la couleur, la turgescence, la taille, etc., montrent une plante en bonne santé. Pourtant transposé, en terme scientifique, cette impression n'est pas facilement mesurable.

Nous avons vu qu'il est extrêmement difficile de donner une définition courte de la santé de la plante, car c'est un concept complexe qu'il est difficile de réduire à une définition concise. Une définition courte risque de ne pas rendre compte de cette complexité. D'autre part comment donner une définition i) sans tomber dans une logique circulaire, ii) sans employer des termes flous qui ne peuvent pas être clairement définis.

La santé de la plante a une place dans les débats scientifiques car c'est un terme immédiatement intelligible par tous et qui renvoie à un intérêt commun (dans ce sens il est assimilable à un Bien Public comme la qualité de l'air, la biodiversité, la qualité de l'eau). Cependant l'utilisation du terme doit faire consensus et être appropriée par les chercheurs, les producteurs, les consommateurs sans faire référence à des théories compliquées ou floues.

Une plante saine est un terme large et flou qui doit être accompagné par des explications sur la traçabilité au regard i) du contexte de production, ii) des intérêts et iii) des conséquences potentielles de sa production. Si les plantes traitées avec un pesticide sont appelées 'saines', le contraste avec les plantes non traitées générera un abîme d'incompréhension de la part des consommateurs. La santé de la plante n'est pas juste l'absence de symptômes, ou une apparence 'saine' (la pomme de la sorcière de Blanche-neige apparaît saine mais est empoisonnée. Ce message est directement intelligible par les consommateurs).

Le terme de santé des plantes est utilisable dans les cas suivants :

- Comme un terme technique pour des questions relatives aux échanges commerciaux internationaux.
- Dans des débats conceptuels comme source d'inspiration de nouvelles idées, d'enjeux et d'objectifs globaux et pour repenser les concepts liés à la protection des plantes.

Il faut préciser toutefois que :

Si la santé de la plante n'est pas un objectif en soi, c'est par contre un enjeu majeur en agronomie qui nécessite pour être atteint la coopération de disciplines scientifiques liées à la protection des plantes, l'agronomie, la science de la qualité des aliments, l'écologie...

Pour les scientifiques travaillant dans le champ de l'agronomie, les vrais objectifs premiers (primaires) sont (restent) les composantes de cette santé de la plante : le rendement, l'intégrité de la plante, la qualité des aliments et la biodiversité.

Pour la suite de cette thèse nous conserverons autant que possible ces recommandations pour parler de la santé de la plante.

Comme une définition du type dictionnaire ne semble pas possible, Döring et al. (2012) proposent d'utiliser un ensemble de procédures qui représentent un ensemble de points de vue.

- Quelle est la perception du pathosystème par les gens impliqués ?
- Est-ce que les organismes pathogènes présents sur la plante affectent négativement sa reproduction, sa croissance, sa survie, ou son développement en comparaison à des plantes sans ce pathogène ?
- Est-ce que les plantes et le pathogène co-évoluent ?
- Est-ce l'état ou le développement au cours du temps qui est changé ou altéré ?
- Est-ce tous les individus ou seulement quelques-uns qui sont affectés ?
- Est-ce que la santé ou le bien-être des humains et/ou les services socioéconomiques sont affectés ?

Et dans le cadre de notre recherche sur le couple caféier/rouille nous aborderons spécifiquement les points suivants :

- *Quel rôle joue l'environnement et les pratiques agricoles ?*

- *Quelle est la capacité de la plante (ou de la population) à survivre, à croître, et à se reproduire sous des conditions de stress incluant des organismes pathogènes. Existe-t-il des effets compensatoires ?*
- *Quel est le potentiel génétique de la plante (ou de la population) pour résister au(x) pathogène(s) ?*
- *Est-ce que la physiologie, la morphologie (le rendement, la qualité, les fonctions de service écosystémiques) des plantes sont modifiées ?*

1.1.2 Impact de l'environnement sur la santé de la plante

1.1.2.1 Interaction stress abiotique / stress biotique et impact sur la santé de la plante

Le champ est un environnement complexe et hétérogène au sein duquel les plantes sont soumises à une combinaison de stress d'intensité variable (Suzuki *et al.*, 2014). Ces stress affectent la plante selon des cycles au cours de son développement, entrecoupés ou non de phases de récupération (Mittler et Blumwald, 2010b). Chaque combinaison de stress va conduire à une réponse unique de la plante associée à un programme unique d'expression des gènes correspondant précisément aux conditions rencontrées et ayant pour but de la préserver ou au moins de lui permettre de survivre, bien souvent au détriment de sa croissance et de sa production (Mittler, 2006; Suzuki *et al.*, 2014) (**Fig. 1**)

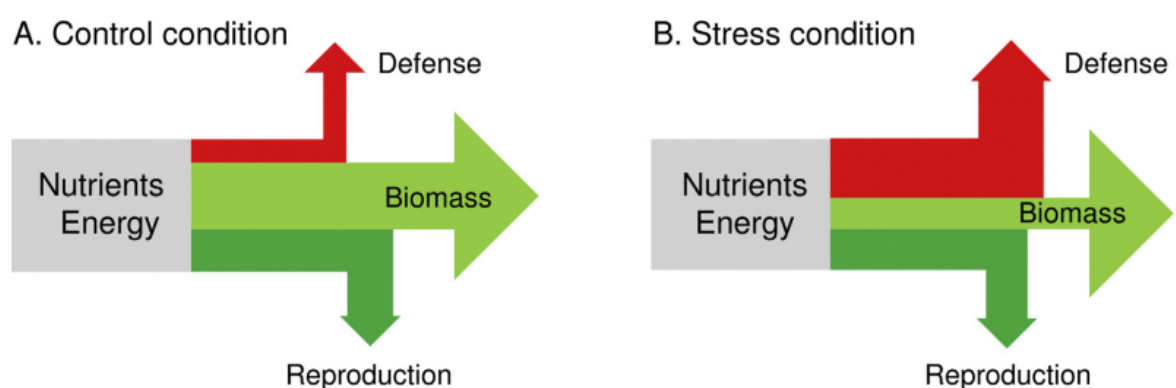


Fig. 1: L'énergie est transférée de la production de biomasse aux programmes de défense. En condition de stress, les nutriments et l'énergie alloués à la production de biomasse sont redirigés vers les processus défensifs. De plus, la reproduction est accélérée en cas de conditions environnementales défavorables (d'après Prasch et Sonnewald, 2015)

Les stress induisent une perturbation du métabolisme qui se traduit par un coût au niveau physiologique. La plante peut aussi choisir d'ignorer certains stress tout en essayant de

s'adapter à d'autres, alors même que ces stress peuvent s'additionner, être antagonistes, ou alors agir en synergie avec un effet décuplé sur la croissance et la productivité (Yasuda *et al.*, 2008). Une plante soumise à un stress thermique aura, par exemple, tendance à ouvrir ses stomates afin de refroidir ses feuilles par transpiration, alors qu'un stress hydrique ou salin aura un effet inverse sur la conductance stomatique. Il a été montré que lors de la combinaison de ces deux types de stress, la température foliaire était de 2 à 5°C plus élevée que lors du seul stress thermique. Cette température foliaire élevée s'accompagne d'une photosynthèse faible, d'une respiration élevée et d'une très faible conductance stomatique (Rizhsky *et al.*, 2004; Prasch et Sonnewald, 2015). La comparaison des plus importantes crises climatiques aux USA entre 1980 et 2012 a permis de calculer que la combinaison de stress thermique et hydrique a causé plus de 200 milliards de \$ de dommages alors que sur la même période la sécheresse en absence de vague de chaleur était responsable de 50 milliards de USD de pertes (Suzuki *et al.*, 2014). L'analyse du transcriptome de plantes soumises à cette combinaison de stress a montré que plus de 770 transcrits participent à la réponse adaptative alors que leur expression ne varie pas dans le cas d'un stress uniquement hydrique ou thermique (Rizhsky *et al.*, 2004). Si les stress abiotiques ont un impact très fort sur la productivité des plantes cultivées, celles-ci doivent aussi faire face à une large gamme de pathogènes et de ravageurs incluant des bactéries, des champignons, des virus, des nématodes et des insectes (Atkinson et Urwin, 2012). Afin de se convaincre de l'intérêt d'étudier des stress multiples, il suffit d'observer les mécanismes de résistance mis en œuvre par les plantes pour y résister. De très nombreux gènes et composés sont communément utilisés pour faire face à différents stress. La plupart des voies de signalisation (phytohormones, cascade de kinases, formes actives de l'oxygène, calcium, ...) et les facteurs de transcription principaux liés aux stress sont activés aussi bien par des stress abiotiques que biotiques, de même que de nombreux métabolites secondaires et flavonoïdes sont accumulés et offrent une protection à des stress divers (Rejeb, Abdelly et Savouré, 2014; Prasch et Sonnewald, 2015). Ceci s'explique notamment par le besoin de la plante de réduire le coût de ces mécanismes d'adaptation qui sont toujours mis en œuvre au détriment de sa croissance et de son développement.

Voici quelques exemples qui illustrent comment les stress, abiotiques et biotiques, peuvent s'additionner, agir en synergie, mais aussi avoir des effets antagonistes les uns sur les autres.

Foyer *et al.* (2016) ont montré comment différents stress abiotiques influencent la réponse de la plante à une attaque de pucerons. L'accumulation de métabolites secondaires et la réduction du niveau d'assimilats dans le phloème réduisent les attaques de ces insectes

piqueurs suceurs. Davila Olivas *et al.* (2016) ont étudié des combinaisons de stress appliquées en séquence et impliquant la sécheresse, un pathogène (*Botrytis cinerea*) et un herbivore (*Pieris rapae*). Dans ce cas, la plante focalise sa réponse sur le dernier stress appliqué. Par contre, la combinaison du stress hydrique et de l'attaque par le phytophage inhibe complètement la réponse de la plante au pathogène. Les virus végétaux bénéficient des températures élevées qui augmentent la quantité et la fécondité des insectes vecteurs, tout en réduisant l'expression des gènes de défense. C'est le cas, par exemple, chez le tabac où le TMV (Tobacco Mosaic Virus) surmonte la résistance procurée par le gène *N* au-dessus de 28°C. De la même façon, l'inactivation du gène *Mi-1.2* à des températures supérieures à 28°C se traduit par des infestations bien supérieures de nématodes et de pucerons chez la tomate.

Chez le tabac et *Arabidopsis*, les gènes *R* et en conséquence la réponse hypersensible à *Pseudomonas syringae* sont inhibés par un stress thermique (Prasch et Sonnewald, 2015). Le stress hydrique peut aussi avoir des effets antagonistes ou synergiques avec les stress biotiques. Chez *Arabidopsis*, l'infection par des nématodes durant un stress hydrique conduit à un profil d'expression des gènes spécifiques et notamment à l'expression de 50 gènes liés à l'adaptation aux stress multiples (Atkinson, Lilley et Urwin, 2013). Prasch et Sonnewald (2015) ont développé un test multi-factoriel pour analyser simultanément trois stress dont deux abiotiques (chaleur, sécheresse) et un biotique (virus). En comparant les stress appliqués un à un ou simultanément, ils ont démontré que la chaleur était le stress majeur et que la combinaison des deux stress abiotiques inhibe la réponse de la plante au stress biotique. Les mécanismes de défense et de signalisation liés à l'attaque virale sont alors abolis. Ils ont montré que différents réseaux de signalisation étaient activés pour chaque combinaison de stress conduisant à une réponse unique de la plante qui adapte au mieux sa physiologie à chaque situation rencontrée. Ce résultat est maintenant classique car de nombreuses études ont montré l'impact négatif des stress abiotiques sur la mise en place des mécanismes de défense des plantes pour lutter contre les ravageurs et les pathogènes (Mittler et Blumwald, 2010b; Atkinson et Urwin, 2012; Suzuki *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2015; Prasch et Sonnewald, 2015). Quelle que soit la combinaison de stress étudiés, la perception du ou des stress est une des étapes cruciales dans la cinétique de réponse de la plante qui va souvent déterminer l'efficacité de sa réponse adaptative. La perception des stimuli de l'environnement qui conduit à une réponse globale implique différentes voies de signalisation dépendant du -ou des- types de stress rencontrés. Une fois le stress perçu par la plante, des canaux ioniques et des cascades de kinases peuvent être activés, des formes actives de l'oxygène, des phytohormones comme l'acide abscissique, l'acide jasmonique, l'acide salicylique, ou l'éthylène peuvent être

accumulés parallèlement à une reprogrammation de la machinerie génétique visant à activer les mécanismes de défense et à modifier le métabolisme afin de tolérer le stress ou au moins de minimiser les dommages biologiques qui en résultent. De façon générale, la perception d'un stress unique va déclencher une réponse rapide et efficace pour une large gamme de stress différents, ainsi qu'une mémoire épigénétique du stress capable de perdurer durant plusieurs générations (Rejeb, Abdelly et Savouré, 2014).

Nguyen *et al.* (2016) ont étudié l'impact de stress abiotiques sur les insectes phytophages. Un stress hydrique aura pour conséquence d'augmenter la résistance aux insectes phytophages grâce à un effet synergique entre la voie de signalisation de l'acide abscissique et celle de l'acide jasmonique, alors qu'un stress causé par une inondation, en activant la voie de l'éthylène, antagoniste de celle de l'acide jasmonique aura un effet négatif sur les mécanismes de défense contre les phytophages. Les mécanismes de tolérance croisés entre stress abiotiques et biotiques, quand ils existent, sont particulièrement intéressants à étudier car ils ont pour effet de rendre la plante plus résistante à un large spectre de stress (Rejeb, Abdelly et Savouré, 2014). Ce phénomène de 'tolérance croisée' a été décrit dans de nombreuses publications. Les blessures physiques augmentent la résistance au stress salin chez la tomate, alors que chez cette même plante, une infection locale par *Pseudomonas syringae* pv. déclenche une réponse systémique protégeant l'ensemble de la plante contre les phytophages. Toujours chez la tomate, le stress hydrique réduit la capacité d'infection de *Botrytis cinerea* et *Oidium neolycopersici* (Achuo, Prinsen et Höfte, 2006). A l'inverse certaines attaques de pathogènes qui entraînent une fermeture des stomates augmentent les résistances de la plante à certains stress abiotiques (Goel *et al.*, 2008).

La tolérance croisée aux stress multiples implique plusieurs grandes voies de signalisations.

Les formes actives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle clé dans les mécanismes d'adaptation des plantes car ce sont à la fois des signaux moléculaires qui régulent différentes voies de signalisation, mais aussi des sous-produits toxiques du métabolisme qui peuvent jouer un rôle en tant que tels dans la défense contre les pathogènes. Chaque compartiment des cellules contient ses propres voies de production et d'élimination des ROS et donc un niveau d'accumulation de ces molécules qui lui est propre et variable dans le temps en fonction des conditions. Les différents stress abiotiques (sécheresse, chaleur, salinité ou lumière intense) induisent des profils d'accumulation de ROS dans les tissus qui leur sont spécifiques et qui déterminent les réponses mises en œuvre par la plante pour y faire face, en partie grâce au rôle qu'ils jouent dans la signalisation de cellule à cellule. Aussi longtemps que les cellules ont

assez d'énergie pour les éliminer, les ROS sont une composante majeure dans la signalisation et la mise en place des mécanismes d'adaptation des plantes aux stress multiples (Kangasjärvi *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2017). Ils sont capables d'activer des facteurs de transcription (ROS-sensitive transcription factors) régulant la transcription de gènes de défense (MAP-kinases, enzymes antioxydantes, déhydrines, protéines du type PR (Pathogenesis related), HSP (Heat shock protein)) (Rejeb, Abdelly et Saviouré, 2014).

Une fois le ou les stress perçus, les cascades de MAP-kinases prennent le relais pour transmettre le signal vers le noyau des cellules. Cela peut se traduire par une production de protéines de défense comme les PR protéines ou des interactions avec les ROS et l'ABA dans la mise en place de mécanismes d'adaptation aux stress combinés (Sharma *et al.*, 2013). Les plantes étant sessiles et ne disposant pas de système nerveux, les phytohormones jouent un rôle central dans la transmission des signaux environnementaux, la communication inter-cellulaire, la gestion de la croissance, du développement et des mécanismes adaptatifs. L'ABA est considéré comme la première hormone impliquée dans la réponse aux stress abiotiques alors que les réponses aux stress biotiques sont généralement régulés par des hormones antagonistes ; l'acide jasmonique / l'éthylène (JA/E) et l'acide salicylique (SA). L'ABA a parfois un rôle positif sur la réponse aux stress biotiques ce qui en fait une molécule aux effets controversés qui varient en fonction de l'environnement (type et séquence de stress). Elle a par exemple un effet activateur sur les mécanismes de défense contre les phytophages (réponse à la blessure) et active la voie de signalisation impliquant l'acide jasmonique couplé aux facteurs de transcription MYC (Nguyen *et al.*, 2016). Lors de stress multiples, l'ABA est généralement antagoniste de l'SA/JA/E induisant une plus grande sensibilité aux maladies et aux herbivores (Kim *et al.*, 2011). D'un autre côté, un stress abiotique conduisant à la fermeture des stomates par le biais de l'ABA aura un effet protecteur contre les pathogènes utilisant les stomates comme point d'entrée dans les tissus foliaires (Lee et Luan, 2012). L'influence de l'ABA lors d'un stress multiple varie selon la combinaison des stress dans le temps. Dans le cas où les stress abiotiques et biotiques surviennent simultanément, le premier effet de l'ABA va porter uniquement sur le stress abiotique car une infection prendra plus de temps à s'établir induisant une réponse plus tardive de la plante. L'ABA va alors induire la fermeture des stomates pour préserver le potentiel hydrique et jouer un rôle négatif sur l'induction des hormones SA, JA/E impliquées dans la réponse à l'infection. Si l'infection survient après le stress abiotique ayant induit l'ABA, son rôle est plus controversé car l'ABA joue un rôle important dans la production de callose servant à prévenir l'invasion des tissus par un pathogène. La présence d'ABA peut

alors induire plus rapidement, ou au contraire réprimer la production de callose en fonction des conditions environnementales.

Enfin, les facteurs de transcription ont un rôle primordial d'effecteurs dans la réponse des plantes aux stress car c'est grâce à eux que se fait la reprogrammation de l'expression des gènes permettant à la plante d'ajuster son métabolisme aux conditions de l'environnement. L'expression de ces gènes clés est directement sous le contrôle des transducteurs de signaux que sont les ROS, les MAP-kinases, le calcium, ou encore les phytohormones (Atkinson, Lilley et Urwin, 2013; Rejeb, Abdelly et Savouré, 2014; Nguyen *et al.*, 2016).

Depuis quelques années, le rôle d'autres phytohormones comme les auxines, les cytokinines, les gibbérellines ou les brassinostéroïdes sur les voies de signalisation (JA/SA/E), la réponse aux pathogènes et plus généralement sur les réponses adaptatives a pu être démontré (Nguyen *et al.*, 2016). Si ces phytohormones peuvent être impliquées dans les mécanismes d'adaptation au stress, c'est tout simplement parce que ces mécanismes sont indissociables des mécanismes physiologiques liés à la croissance et au développement, ainsi qu'à l'énergie dont la plante va disposer pour s'adapter. Par exemple, les cytokinines sont réparties dans les feuilles en fonction de leur degré de transpiration lui-même lié à leur exposition à la lumière. De façon similaire, la teneur des feuilles en phytochrome B (forme pfr ou rouge lointain) constitue un autre « tag » moléculaire indiquant la valeur de la feuille d'un point de vue photosynthétique. Quand la teneur en cytokinines et en PhyB pfr est faible, la feuille reçoit peu de lumière et les voies de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique sont inhibées ainsi que la plupart des mécanismes de défense contre les herbivores et les pathogènes. La plante semble ne pas dépenser d'énergie pour protéger des feuilles qui présentent un trop faible rendement photosynthétique (Ballaré, 2014). Les photorécepteurs à l'image du phytochrome B et de UVR8 permettent à la plante de percevoir l'ombrage ou la proximité de compétiteurs. Une modification du ratio 'rouge proche / rouge lointain' et/ou des radiations UV-B entraînent, via ces photorécepteurs, une diminution drastique des capacités de la feuille de lutter contre les ravageurs et les maladies en inhibant les voies de signalisation (JA/SA) ou l'accumulation de métabolites secondaires (notamment phénoliques). Les UV-B et UV-C sont effectivement connus comme un moyen de réactiver les mécanismes de défense des plantes pour lutter contre les stress biotiques (Demkura et Ballaré, 2012; Darras, Bali et Argyropoulou, 2015).

Outre ces photorécepteurs, l'activité photosynthétique elle-même est responsable de la sensibilité des plantes aux stress biotiques dans la mesure où elle est responsable du statut énergétique des cellules et donc de sa capacité à s'adapter à un stress. La photosynthèse est

aussi à l'origine de la production de ROS et de sucres impliqués dans les réponses aux agressions, aussi bien d'un point de vue signalétique que comme effecteurs. Au niveau morphologique, l'intensité lumineuse est directement responsable de la morphologie de la feuille (plus épaisses et plus résistance aux herbivores pour des intensités lumineuses élevées), de la conductance stomatique (point d'entrée de nombreux pathogènes) et de la répartition des cytokinines via le xylème (modulateur positif de la synthèse de JA et de la réponse à SA) (Ballaré, 2014). Enfin, les plantes et tout particulièrement les arbres, sont construits par réitération de 'phytomères', principe à la base de leur stratégie de développement. La plante peut choisir de sacrifier certains organes ou certains phytomères devenus inutiles et en produire de nouveaux plus adaptés à la capture des ressources dont elle a besoin. Cette modularité explique pourquoi la plante choisit de focaliser ses efforts en termes de défense et d'adaptation en fonction de la valeur relative de chacun de ses phytomères. Généralement, ce qui est aussi le cas du caféier, les feuilles jeunes qui concentrent l'azote et participent le plus à l'assimilation du CO₂, sont mieux défendues contre les agressions de pathogènes ou de ravageurs que les feuilles âgées (Meldau, Erb et Baldwin, 2012).

1.1.2.1.1 Vigueur de la plante, trade-off croissance / adaptation

Avant de s'intéresser à la répartition des ressources entre croissance et mécanismes adaptatifs chez les plantes, il faut décrire les mécanismes et régulations à la base de la croissance des végétaux.

La croissance chez les plantes se fait grâce à la division cellulaire de populations de cellules maintenues au niveau des méristèmes apicaux et racinaires, puis à l'élongation des nouvelles cellules. Ce mécanisme de croissance de la plante, continu dans le meilleur des cas, est finement contrôlé par des signaux environnementaux notamment lumineux et thermiques et par des hormones comprenant les auxines, les brassinostéroïdes et les gibbérellines, sans oublier l'horloge circadienne qui orchestre la croissance dans le temps (Sparks, Wachsman et Benfey, 2013; Mora-García, de Leone et Yanovsky, 2017). Ces signaux convergent vers un 'module central intégrateur' formé de facteurs de transcription et de régulateurs qui contrôlent un grand nombre de gènes. Les autres signaux environnementaux ou endogènes influent aussi sur ce module central pour contrôler la croissance (Chaiwanon *et al.*, 2016). D'un point de vue développemental, la plante intègre les signaux lumineux à différentes longueurs d'onde grâce à ses photorécepteurs (Casal, 2013). Les phytochromes et les cryptochromes participent à la régulation de l'élongation cellulaire via deux classes de facteurs de transcription qui ont des fonctions opposées. Les phytochromes interacting factors (*PIFs*) du type bHLH sont des

régulateurs positifs de la croissance cellulaire qui sont inactivés par les phytochromes photo-activés qui empêchent leur fixation à l'ADN et entraînent leur phosphorylation, leur ubiquitination et leur dégradation. Certains *PIFs* sont aussi inactivés par une interaction directe avec les cryptochromes. La transcription de certains gènes *PIF*, comme *PIF4* et *PIF5*, est directement sous le contrôle de l'horloge circadienne (Leivar et Monte, 2014). *Elongated Hypocotyl5* (HY5), GATA2/4 et BZS1 sont des régulateurs négatifs de l'élongation cellulaire qui sont dégradés à l'obscurité par une E3 ubiquitin ligase *constitutive photomorphogenic1* (*COP1*) elle-même inactivée à la lumière par les phytochromes et les cryptochromes (Casal, 2013).

Les hormones servent ensuite de relais aussi bien d'un point de vue signalétique que comme effecteurs de la réponse. Les auxines régulent l'expression de nombreux gènes et stimulent l'élongation cellulaire en activant les facteurs de transcription du type *auxin-response factor* (ARF). Ces ARFs sont réprimés par les protéines Aux/IAA dont la dégradation est elle-même induite par les auxines. Les gibbérellines (GA) agissent par le biais d'un récepteur intra-cellulaire, comme les auxines, afin d'entraîner l'ubiquitination et la dégradation d'une famille de répresseurs clés, les protéines DELLAs. L'accumulation de ces protéines inhibe l'activité des PIFs et de nombreux autres facteurs de transcription comprenant BZR1 et ARF6 (voies de signalisation des auxines). Les DELLAs sont aussi capables d'interagir avec différentes classes de protéines pouvant se fixer à l'ADN pour induire la transcription de certains gènes, impliqués notamment dans la voie de signalisation par les cytokinines qui contrôlent aussi la photomorphogenèse (Casal, 2013; Lozano-Durán et Zipfel, 2015; Chaiwanon *et al.*, 2016).

Des études récentes ont démontré que les voies de signalisation impliquant les auxines, les gibbérellines et les phytochromes convergeaient par interaction directe des facteurs de transcription que ces voies contrôlent (Chaiwanon *et al.*, 2016). BZR1, PIF4 et ARF6 interagissent entre eux et partagent de très nombreux gènes cibles. L'interaction de ces trois facteurs de transcription se traduit par un renforcement de leur activité transcriptionnelle sur de nombreux gènes liés à l'élongation cellulaire et conduit à une augmentation de la croissance de l'hypocotyle. La coopération entre BZR1, ARF6 et PIF4 ainsi que leur inhibition par les DELLAs forme un module appelé BZR-ARF-PIF4/DELLA (BAP/D) module. Ce module BAP/D est très flexible car ses composants peuvent fonctionner indépendamment sur certains gènes cibles qui contrôlent eux-mêmes de nombreux sous-groupes de gènes. Afin de maintenir l'homéostasie, ce module comprend différents systèmes

d'inhibition et de rétro-contrôle. Les auxines, les BRs et les GAs sont par exemple capables de rétro-contrôles négatifs sur leur biosynthèse, de même que la lumière, via les photorécepteurs, contrôle l'activité des gènes PIFs. Cette coopération de différentes voies de signalisation assure une réponse cohérente aux différents signaux que reçoit la plante. Par exemple, l'activation des PIFs par l'ombrage va stimuler la biosynthèse d'auxine qui sera transportée vers la tige pour y activer l'élongation cellulaire. Le module BAP/D est couplé à un autre module tripartite composé de protéines du type « helix-loop-helix » (HLH) et « basic helix-loop-helix » (bHLH) aussi impliquées dans la croissance cellulaire. Ces protéines, à l'image de *paclobutrazole resistant 1* (PRE1) ont pour rôle de séquestrer des régulateurs de croissance négatifs comme PAR1, HFR1, IBH1 et les AIFs. PAR1 et HFR1 sont des inhibiteurs de l'activité transcriptionnelle des PIFs. IBH1 et les AIFs sont des inhibiteurs des facteurs d'activation de la croissance cellulaire (notamment HBI1, ACEs, CIB5, BEE2).

La combinaison BAP/D-HHbH contrôle donc la croissance cellulaire en intégrant de très nombreux signaux aussi bien endogènes qu'environnementaux (Chaiwanon *et al.*, 2016). BAP/D-HHbH est aussi en partie contrôlé par l'horloge circadienne dans la mesure où celle-ci, via l'Evening Complex contrôle l'expression des gènes PIF4 et PIF5 (Lucas and Prat, 2014). La chaleur active aussi l'expression de PIF4 et a par ce biais un impact positif sur la croissance cellulaire. Un stress abiotique en induisant une accumulation des DELLAs va réduire la croissance. La dégradation des sucres régulée par BZR1 contribue à l'arrêt de la croissance dans des conditions de « famine cellulaire » (Chaiwanon *et al.*, 2016). La liste des exemples est bien plus longue et tend à montrer que de très nombreuses informations convergent vers le complexe BAP/D-HHbH qui est central dans le contrôle de la croissance cellulaire.

1.1.2.1.2 Croissance et développement ou réponses au stress, une affaire de compromis !

Un des compromis le plus étudié et le plus documenté est celui que la plante doit faire quand elle est confrontée à des pathogènes (Lozano-Durán et Zipfel, 2015; Naseem, Kaltdorf et Dandekar, 2015; Chaiwanon *et al.*, 2016). Se défendre ou se développer, voilà le dilemme auquel les plantes doivent faire face et qui est souvent une question de vie ou de mort. Les mécanismes de défense des plantes contre les ravageurs et les pathogènes sont plus ou moins inactifs en absence de stress et sont stimulés par la blessure ou la reconnaissance au niveau cellulaire d'un pathogène. Dans la mesure où ces mécanismes sont coûteux en énergie la plante peut choisir de les minimiser, de répartir leur intensité dans les phytomères en fonction de leur intérêt ou encore de les abolir. Cette balance entre croissance et défense étant cruciale,

elle implique de nombreuses voies de signalisation et le module BAP/D-HHbH comme intégrateur des signaux endogènes et environnementaux.

La voie de signalisation des brassinostéroïdes (BR) et celle dite de la « flagellin » sont un bon exemple de compromis entre croissance et défense. Le peptide Flg22 issu de la protéine de flagelle bactérienne peut être perçu comme le signal d'une attaque bactérienne (pathogen-associated molecular pattern ou PAMP) par le récepteur kinase (RK) du type LRR-RK appelé FLS2 (flagellin-sensitive2). Ce récepteur a une structure similaire au récepteur BRI1 qui transmet dans les cellules le signal BR. FLS2 et BRI1 ont le même co-récepteur kinase BAK1 et partagent certains de leurs substrats comme les kinases BSK1 et BIK1 (Botrytis-induced kinase1). Un co-traitement BR et Flg22 montre que le signal BR réduit la réponse des cellules à Flg22. BIK1 est un substrat des kinases FLS2 et BRI1 qui régule de façon positive les mécanismes de défense et négativement la voie de signalisation BR. Inversement, BZR1, le relai intra-cellulaire des BRs régule négativement la réponse aux pathogènes. Enfin, le signal Flg22 inhibe la transcription du gène *HB11* ce qui contribue à inhiber la croissance et à activer les mécanismes de défense. La sur-expression de *HB11* supprime la réponse immune aux pathogènes et restaure la croissance cellulaire causée par Flg22. Le gène *HB11* a donc un rôle central dans le compromis entre croissance et défense. Dans les tissus âgés, l'expression du gène *IHB1* entraîne l'inhibition de *HB11* et donc l'arrêt de la croissance, mais aussi la répression de la réponse immune. Flg22 en plus de stimuler les mécanismes de défense est capable d'inhiber la voie de signalisation par les auxines pour donner la priorité à la réponse immune sur la croissance. Flg22 induit en effet la production du micro-ARN miR393 qui cible la dégradation des ARNm des gènes *TIR1*, *AFB2* et *AFB3* (récepteurs d'auxine). Flg22 induit aussi l'accumulation d'acide salicylique qui stabilise les inhibiteurs de signal auxinique intra-cellulaire Aux/IAA. De façon similaire aux auxines et GAs, l'acide jasmonique (JA) induit la dégradation de répresseurs de la transcription. Les gènes répondant au JA sont sous le contrôle de facteurs de transcription comme MYC2, inactif en absence de JA car inactivé par des protéines JAZ. JA en association avec son récepteur COI1 induit l'ubiquitination des JAZ protéines et restaure l'activité de MYC2. Les protéines JAZ interagissent avec les protéines DELLAs pour empêcher ces dernières d'inactiver les PIFs, ce qui dans ce cas empêche les JAZ d'inhiber MYC2. Ces interactions antagonistes permettent au JA d'activer les mécanismes de défense en condition de lumière normale. Dans ce cas, JA induit la libération des DELLAs (élimination des JAZ) qui inhibent les PIFs et donc la croissance. Ceci explique aussi pourquoi la réponse immune est réduite lors d'un manque de lumière. Dans ce cas, l'ombrage entraîne l'augmentation des GAs qui inhibent les DELLAs (les PIFs activent

la croissance) et libèrent les JAZ qui inactive MYC2 (inactivation de la réponse immune) (Fig. 2).

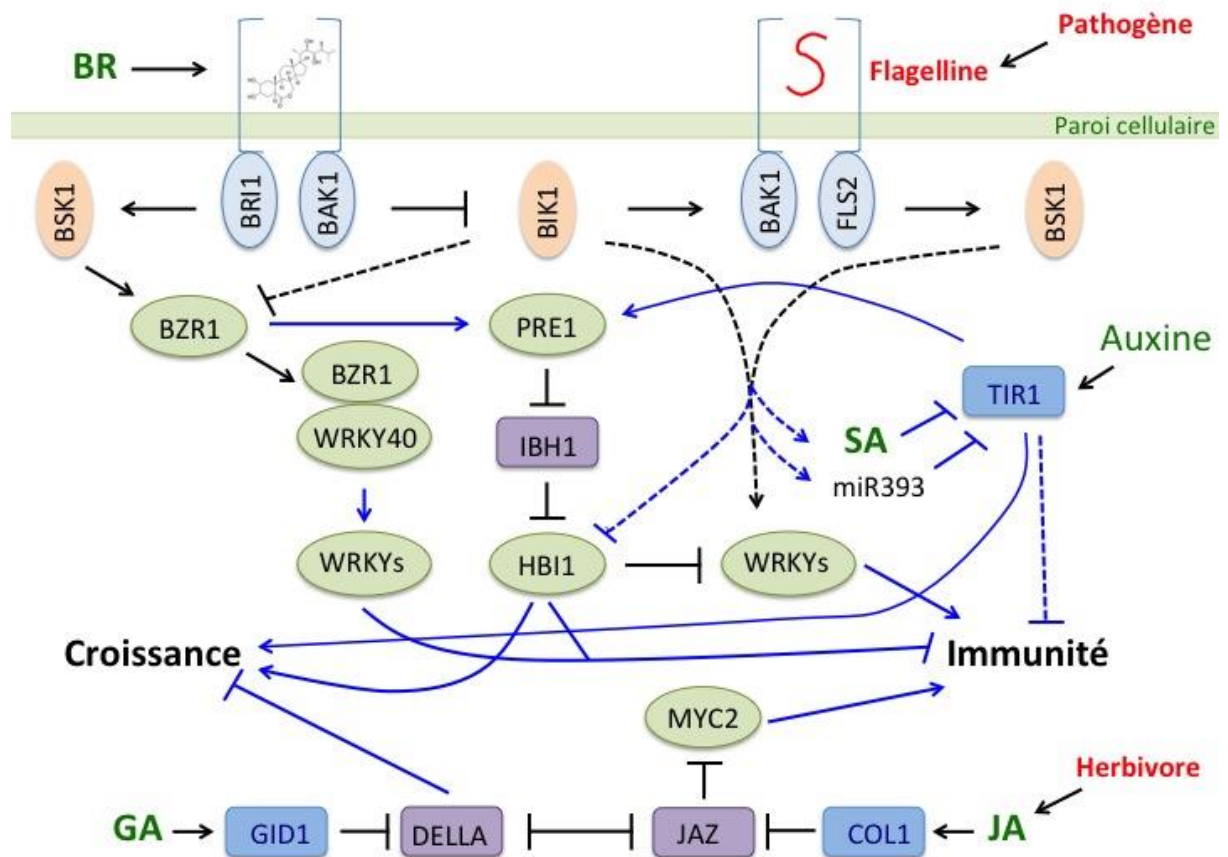


Fig. 2: Mécanismes de régulation du compromis entre croissance, défense contre un pathogène et attaque par un herbivore. Les flèches noires indiquent les régulations transcriptionnelles, et les bleues les régulations au niveau protéique. Les flèches en pointillés indiquent que les mécanismes ne sont pas connus.

Cet exemple peut paraître compliqué au premier abord, pourtant comme le montre la Fig. 2, une partie des mécanismes de régulation transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle restent inconnus. De plus, cet exemple simplifié montre comment les plantes ont développé un système extrêmement sophistiqué de traitement de l'information au niveau intra-cellulaire afin d'intégrer une incroyable quantité de signaux endogènes et environnementaux et produire une réponse cohérente au niveau métabolique. Ce n'est que récemment que des travaux ont été initiés pour essayer de comprendre comment les informations venant de l'ensemble des voies de signalisation sont traitées les unes par rapport aux autres en tenant compte du programme de développement pour aboutir à une réponse cohérente et coordonnée aussi bien au niveau cellulaire, qu'entre cellules et organes. Le module BAP/D-HHbH démontre comment un tel flux d'informations environnementales et hormonales converge vers un point de contrôle central pour coordonner une réponse adaptée et dynamique dans le temps en terme

de croissance cellulaire. Actuellement 400 récepteurs kinases sont connus chez *Arabidopsis* et 600 chez le riz. Entre le nombre de récepteurs et le haut degré de connexions et d'interconnexions entre les voies de signalisation, la complexité du système de traitement de l'information en temps réel des cellules végétales, il y a matière à défier notre capacité d'analyse et de compréhension.

1.1.2.1.3 La gestion des stress chez les hybrides

Outre le fait que les hybrides présentent une vigueur supérieure qui résulte d'une meilleure gestion des ressources de leur environnement, une publication récente de Miller *et al.* (2015) offre une nouvelle perspective pour appréhender l'efficacité des hybrides face aux stress environnementaux. En absence de stress, les gènes de réponse aux stress sont réprimés chez les hybrides par des mécanismes épigénétiques et les régulateurs de l'horloge circadienne afin de disposer de plus d'énergie pour leur croissance et leur développement. En condition de stress, les hybrides induisent fortement l'expression des gènes de réponse aux stress à certains moments de la journée pour lutter contre le -ou les- stress auxquels ils ont à faire face. Ils présentent aussi une meilleure récupération post-stress que leurs parents. La dérégulation des principaux régulateurs de l'horloge circadienne chez les hybrides favorise non seulement la photosynthèse et la production de sucres, mais aussi un meilleur timing de l'expression des gènes d'adaptation aux stress ce qui a pour conséquence un meilleur compromis dans l'utilisation des ressources entre croissance et adaptation. Le fait qu'ils retrouvent une activité métabolique normale plus vite que leurs parents explique aussi la vigueur hybride.

1.1.3 Influence génotypique sur la santé de la plante

Le génotype est l'information portée par le génome d'un organisme. Le génotype d'un individu représente la composition allélique de tous les gènes de cet individu.

Chez les Eucaryotes en général et chez les angiospermes en particulier la complexité du génome d'un génotype varie en fonction de trois paramètres :

- La ploïdie, c'est-à-dire le nombre d'exemplaires dans une cellule donnée ou dans les cellules d'un organisme, de jeux complets des chromosomes du génome de ce type d'organisme.

- L'hétérozygotie (vs l'homozygotie) qui au niveau du génome peut se définir comme le taux de gènes pour lesquels il existe deux allèles différents.
- L'épigénétique qui concerne des variations d'accès au génome et de la régulation de son expression qui peuvent être induites par des facteurs environnementaux.

1.1.3.1 La polyploïdie

1.1.3.1.1 Les différents types de polyploïdie

Notre modèle d'étude *Coffea arabica* est un allopolyploïde naturel relativement récent (< 50000 ans) constitué de sous-génomes (E^a et C^a) provenant d'espèces parentales africaines diploïdes proches génétiquement, *Coffea eugenoides* et *Coffea canephora*. *Coffea arabica* est issu d'une région limitée du Sud-ouest de l'Ethiopie où aucune autre espèce de *Coffea* ne serait présente. L'espèce polyploïde et ses deux espèces parentales se développent à des altitudes et à des températures différentes.

1.1.3.1.2 Formation des polyploïdes

La formation de nouvelles espèces peut se produire à la suite d'une hybridation interspécifique réunissant deux génomes plus ou moins divergents ayant évolué indépendamment et/ou d'une duplication du génome. La spéciation polyploïde conduit soit à la formation d'espèces allopolyploïdes issues d'une hybridation interspécifique et d'une duplication du génome soit à la formation d'espèces autopolyploïdes issues uniquement d'une duplication du génome. Les hybrides interspécifiques ont une stérilité plus ou moins importante due à une divergence des génomes parentaux induisant des incompatibilités génomiques et des problèmes d'appariement chromosomique à l'origine de méioses irrégulières. Chez les espèces allopolyploïdes, la duplication du génome restaure une certaine fertilité, après une ou plusieurs générations.

Les génomes allopolyploïdes ne représentent donc pas la simple addition et duplication des génomes parentaux. Dès les premières générations, des changements importants peuvent intervenir et modifier la structure et le fonctionnement des génomes. Les changements provoqués par l'hybridation et la duplication du génome contribueraient à une plus grande plasticité phénotypique et à de nouvelles capacités adaptatives des espèces nouvellement formées. Ces changements peuvent être considérés comme génétiques se traduisant par des éliminations de séquences et des réarrangements chromosomiques ou comme épigénétiques

faisant intervenir la méthylation de l'ADN ou des histones, l'acétylation des histones, ou les petits ARNs (Rapp et Wendel, 2005). Des changements dans le fonctionnement des génomes se traduiraient par des changements d'expression transcriptomique et/ou protéomique des génomes. Ces dernières années, le rôle de l'allopolyplœdie dans les variations d'expression génique a fait l'objet de nombreuses études (Hegarty *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Chaudhary *et al.*, 2009; Rapp, Udall et Wendel, 2009; Chagué *et al.*, 2010; Chelaifa, Mahé et Ainouche, 2010; Flagel et Wendel, 2010; Dong et Adams, 2011). Au niveau transcriptomique, l'expression des gènes peut être observée sous deux angles, soit en étudiant de façon globale la divergence d'expression entre l'allopolyplœide et ses espèces parentales soit en mesurant le ratio des transcrits dérivant de chaque gène homéologue.

1.1.3.1.3 Polyplœides et adaptation

La polyplœdie est un mécanisme majeur d'adaptation et de spéciation chez les végétaux (Ramsey *et al.*, 1998; Otto et Whitton, 2000; Adams, 2007). Les polyplœides seraient à l'origine de phénotypes nouveaux et de conquêtes de nouvelles niches écologiques (Otto et Whitton, 2000; Adams, 2007). Dans des environnements adaptés aux parents diploïdes, les polyplœides et diploïdes se développent et cohabitent alors que dans des environnements non adaptés aux parents diploïdes tels que les hautes altitudes et latitudes où les températures sont plus froides, les polyplœides survivent mieux que leurs parents diploïdes (Chen, 2007). La plupart des auteurs s'accorde sur la théorie que l'hybridation et la duplication à l'origine des polyplœides joueraient un rôle important dans la plasticité phénotypique et les capacités adaptatives des nouvelles espèces. Ces capacités adaptatives à de nouvelles niches écologiques peuvent être illustrées par le cas des plantes invasives (Prentis *et al.*, 2008) et des plantes arctiques (Brochmann *et al.*, 2004). Brochmann *et al.* (2003) soulignent que le succès de l'évolution des polyplœides dans la zone arctique serait basé sur l'état d'hétérozygotie fixé de leur génome. Cet état permettrait une meilleure survie des espèces pendant des périodes climatiques instables. Ces espèces à fortes capacités adaptatives ont été domestiquées et largement exploitées par l'homme. Un grand nombre de ces espèces, telles que le blé, le coton, le maïs ou encore le café, ont aujourd'hui un rôle économique majeur.

On peut associer les génomes polyplœides à de nombreux changements phénotypiques à forte valeur adaptative. Une plus grande variabilité par rapport aux caractères parentaux concernant la vigueur et la biomasse chez *Arabidopsis* (Ni *et al.*, 2009), la période de floraison chez Brassica et triticum (Lukens *et al.*, 2004; Takumi *et al.*, 2009), l'amplitude écologique et la tolérance à un stress abiotique (Maricle *et al.*, 2006; Ainouche *et al.*, 2009)

ont été observées. La polyploïdie serait la clef de la diversification des espèces végétales (Soltis et Soltis, 2009) et de leur succès évolutif à long terme (Van de Peer, Maere et Meyer, 2009).

1.1.3.2 Hétérozygotie vs homozygotie : hybrides versus lignées

Chez les plantes cultivées on utilise des variétés (au sens cultivar mais aussi variétés protégées) obtenues par sélection. Du point de vue de l'amélioration des plantes, une variété peut être considérée comme une population artificielle à base génétique étroite, de caractéristiques agronomiques assez bien définies et reproductible de façon plus ou moins stricte selon un mode de production déterminé (Gallais, 1990). Une variété est définie par l'expression des caractères résultant d'un génotype (ou d'une composition connue et reproductible de génotypes). Pour qu'une variété soit reconnue comme telle, il faut qu'elle satisfasse aux critères simples de DHS (D : distincte des autres ; H : homogène ; S : stable au cours du temps et des processus de reproduction). On distingue les variétés populations, synthétiques, hybrides, fixées et les variétés clones (qui peuvent être des clones d'hybrides). Dans notre étude nous avons comparé des lignées à des clones d'hybrides F1. C'est ce que nous discutons ci-dessous. Les variétés lignées sont en théorie formées d'un seul génotype homozygote. En pratique il peut y avoir un certain résidu d'hétérozygotie. Les variétés hybrides résultent du croisement contrôlé de deux parents (qui sont en général des lignées).

1.1.3.2.1 Hétérosis et vigueur

Chez les espèces diploïdes, le croisement d'individus consanguins non apparentés crée un effet de vigueur dans la descendance, que l'on appelle l'hétérosis. La définition de l'hétérosis, est définie, pour un caractère donné, comme la supériorité de l'hybride par rapport au meilleur de ses parents : $HP_{max} = FI - P_{max}$.

L'hétérosis est donc définie au niveau phénotypique sans hypothèse génétique. On constate que l'hétérosis est plus important chez les plantes allogames que chez les autogames et plus important chez les espèces diploïdes que chez les polyploïdes.

En effet chez les allogames, la consanguinité provoque une forte dépression de vigueur, en conséquence l'effet de vigueur est très élevé. Il est estimé à plus de 100 à 400% pour le rendement chez de nombreuses espèces allogames alors que chez les plantes autogames l'avantage de l'hybride se situe entre 15 et 60% (Gallais, 2009). L'hétérosis varie en fonction des organes ; il est plus important pour les caractères complexes que pour des caractères à

déterminisme génétique simple (tels que la longueur de la feuille). L'hétérosis est également plus marqué pour les caractères les plus fortement liés à la valeur sélective comme la fertilité.

Aujourd'hui on s'accorde à penser que l'hétérosis général est souvent assimilé à l'accumulation de petites performances supérieures dans plusieurs tissus et à différentes phases du développement (Schnable et Springer, 2013). L'hétérosis est donc un attribut dynamique qui est influencé par l'environnement et les phases de développement (Tollenaar, Ahmadzadeh et Lee, 2004).

D'ailleurs, l'hétérosis apparaît plus fort en milieux défavorables qu'en milieu favorable. Les lignées homozygotes sont plus plastiques (elles varient plus en fonction du milieu) que les hybrides, qui eux sont plus stables (homéostasie) en fonction des milieux. L'homéostasie est une composante essentielle de l'hétérosis. Cet effet d'homéostasie est également observé chez les allopolyploïdes. La plus grande vigueur et homéostasie de l'hybride (idem pour les allopolyploïdes) viendraient de la complémentation entre allèles (donc de l'hétérozygotie) et/ou des interactions épistatiques d'allèles 'majeurs' à différents loci des deux parents (Shull, 1908; Jones, 1917).

L'interaction des deux jeux chromosomiques des génomes parentaux entraîne des variations transcriptomiques dans différents tissus, sous différentes conditions ou différents stades de développement des plantes et pourrait expliquer la base génétique et moléculaire de la vigueur hybride (Kaepler, 2012; Schnable et Springer, 2013). Le modèle sous-jacent est que l'hétérosis dépend des interactions d'allèles et d'épiallèles spécifiques venant des parents, ce qui fait que l'hétérosis mesuré chez les hybrides peut être à des niveaux très différents au sein d'une même espèce. Des études portant sur le transcriptome d'hybrides F1 ont été développées chez plusieurs espèces (riz, maïs, et blé) (Baranwal *et al.*, 2012). Les changements transcriptionnels observés ont été généralement associés avec des processus impliquant la biomasse (Meyer *et al.*, 2004), l'absorption de phosphate (Narang et Altmann, 2001), la résistance au froid (Rohde, Studer et Chu, 2004), la signalisation hormonale et l'horloge circadienne (Ni *et al.*, 2009).

1.1.3.2.2 Rôle du rythme circadien dans la vigueur hybride et la santé de la plante

Le niveau d'énergie requis pour supporter la plus forte croissance des hybrides a été attribué à des modifications des rythmes de l'horloge circadienne. L'horloge circadienne régule des processus clés tel que la photosynthèse durant la journée ou l'utilisation de l'amidon pendant la nuit (Michael *et al.*, 2003; Dodd *et al.*, 2005). Les oscillations peuvent

varier en amplitude entre les parents et l'hybride. Ni *et al.* (2009) attribuent l'hétérosis à cette variation en amplitude. Chez les hybrides comparés à leurs parents, des changements dans l'expression des principaux facteurs de transcription de l'horloge circadienne ont été observés chez les hybrides F1 de différentes espèces et chez les allopolyploïdes en comparaison avec les parents diploïdes, et ont été associés à des changements dans les capacités photosynthétiques et la production d'énergie (Swarup *et al.*, 1999; Michael *et al.*, 2003; Ni *et al.*, 2009; Miller, Zhang and Chen, 2012; Shen *et al.*, 2012). L'horloge circadienne est sous le contrôle de régulations épigénétiques (Ni *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2012), ce qui suggère que les différentiels d'expression des régulateurs de l'horloge pourraient être la conséquence de changements dans l'épigénome de l'hybride.

1.1.3.2.3 Hétérosis et maladie

Il y a quelques cas connus où l'hétérozygote est plus résistant que l'homozygote à une maladie. Le cas le plus étudié est sans doute celui de l'anémie falciforme chez l'homme qui confère une plus grande résistance au paludisme. Il existe deux types d'hémoglobine HbA (normal) et HbS (mutant). La forme HbS homozygote est associée à une déformation des globules rouges et peut être mortelle. Par contre les porteurs sont résistants à la malaria. Chez l'hétérozygote on observe les deux formes d'hématies. La forme HbA/HbS résiste à la fois à l'anémie et à la malaria. A notre connaissance il n'y a pas de cas semblables décrits chez les plantes.

Chez les brassicacées, les réponses de défense aux pathogènes sont fréquemment associées à la production de métabolites tels que les flavonoides et les glucosinates. Les gènes associés à la biosynthèse de ces composés sont surreprésentés parmi les gènes sous-régulés chez trois hybrides d'*Arabidopsis*. Groszmann *et al.* (2014) ont ainsi observé que les fonctions de défense biotiques sont significativement affectées chez les hybrides, ce qui tendrait à montrer que les hybrides ont une réponse de défense basale plus faible que leurs parents. Pourtant lorsque Yang *et al.* (2015) inoculent le pathogène '*Pseudomonas syringae*' sur ces mêmes hybrides ils notent qu'ils accumulent moins de bactéries que leurs parents. Les comparaisons des transcriptomes entre les hybrides et leurs parents après inoculation révèlent que plusieurs gènes clés de la voie de biosynthèse de l'acide salicylique (AS) sont significativement sur-régulés chez les hybrides et que le niveau d'acide salicylique est supérieur chez les hybrides. Yang *et al.* (2015) l'expliquent par des modifications de l'histone H3Ac dans la région promotrice de 4 gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AS.

En réponse à l'invasion du pathogène, la biosynthèse de l'AS est donc activée comme une stratégie de défense. Cependant, les gènes clés impliqués dans la biosynthèse de l'AS sont sur exprimés chez les hybrides par rapport à leurs parents, probablement au travers d'une régulation de modifications de l'histone (tel que l'acétylation de l'histone H3) (Fig. 3)

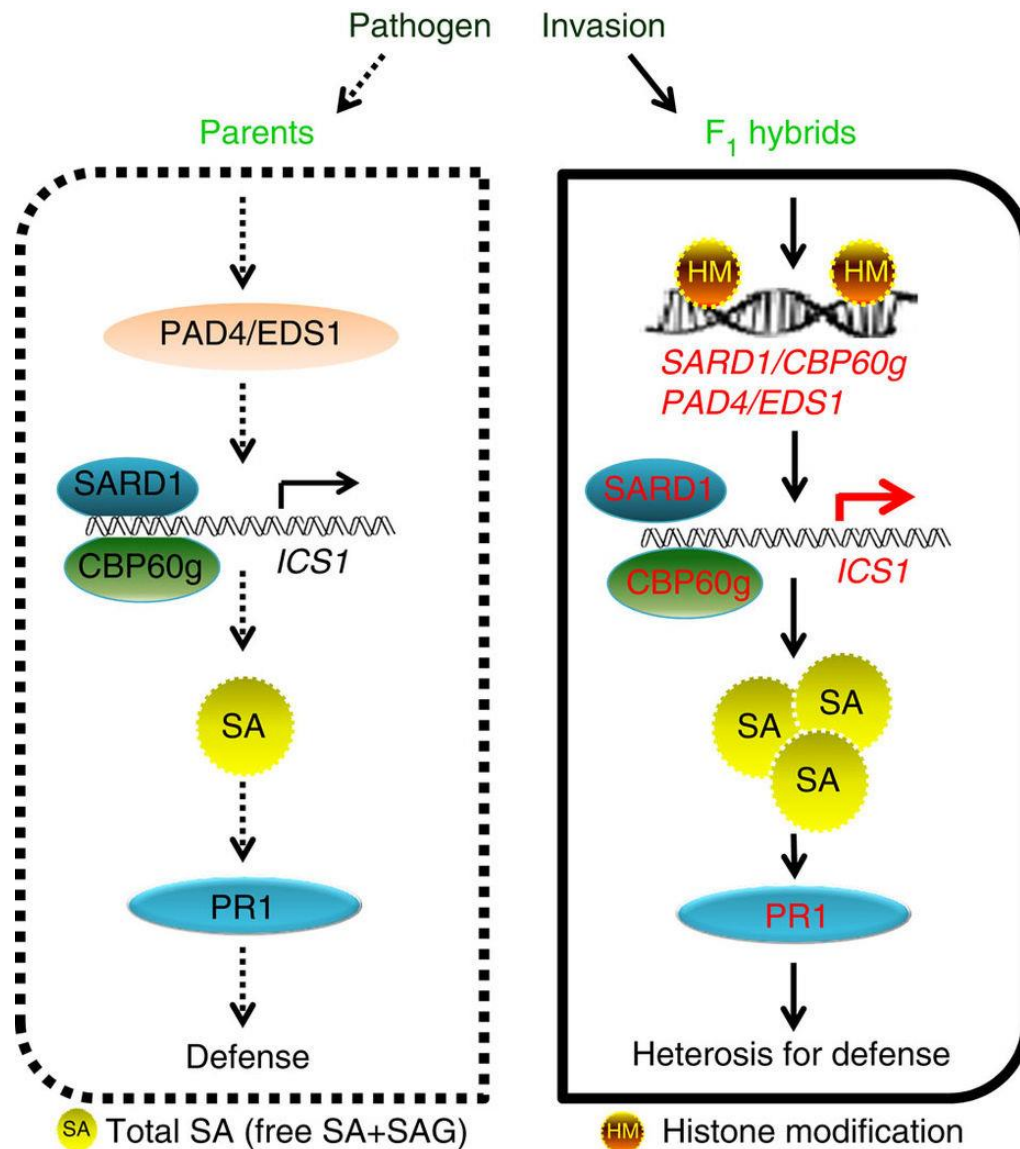


Fig. 3: Modèle expliquant la synthèse accrue d'acide salicylique chez les hybrides. La synthèse d'acide salicylique est activée chez les hybrides F1 d'*Arabidopsis thaliana* et leurs parents en présence de pathogènes. Il s'agit d'une stratégie de défense. Ce phénomène n'est pas observé en absence de pathogène. Les gènes impliqués dans la synthèse d'acide salicylique sont surexprimés chez les hybrides F1, probablement dû à une modification des histones (telle que l'acétylation de l'histone H3). Ainsi, les hybrides F1 présentent les plus hauts niveaux d'acide salicylique, ce qui joue un rôle important dans la résistance accrue des hybrides aux pathogènes biotrophes (d'après Yang *et al.*, 2015)

1.1.3.3 Rôle de l'épigénétique dans la vigueur hybride chez les hybrides et les allopolyploïdes

L'émergence des approches génomiques et épigénétiques suggère que l'hétérosis trouve sa source dans l'interaction entre génomes parentaux, aboutissant à la modification de la régulation de gènes impliqués dans la croissance, la tolérance aux stress, et l'adaptation et la reproduction (fitness) des plantes (Miller *et al.*, 2015). Des modifications épigénétiques de gènes régulateurs clés chez les hybrides ou les allopolyploïdes peuvent modifier en cascade des réseaux de gènes impliqués dans la physiologie et le métabolisme et aboutissant à des manifestations d'hétérosis (Chen, 2013). Au niveau épigénétique, Groszmann *et al.* 2014, ont montré que les hybrides manifestent une réduction significative (~27%) des 24-nt siRNA à des loci ayant des niveaux très différents de siRNA entre les parents. Cela suggère que les 24-nt siRNA génèrent des différences dans l'activité des gènes en modifiant leur degré de méthylation et peut contribuer à la vigueur hybride. La diversité épigénétique entre écotypes entraîne des augmentations de la variabilité épi-allélique qui contribueraient à l'hétérosis.

Les gènes régulateurs qui codent en amont pour la transcription et la régulation sont sur-représentés dans la population des gènes avec des niveaux de siRNA modifiés chez les hybrides suggère que les changements en siRNA et en niveaux de méthylation pourraient être des facteurs clés et les premiers événements dans la cascade de la modification de l'expression des gènes liés au métabolisme et à la physiologie et qui contribuent *in fine* aux phénotypes hétérotiques. Le concept de changements précoces dans des gènes clés dont les zones promotrices seraient affectées par des altérations épigénétiques et qui agiraient ensuite en cascade sur des réseaux de gènes entiers pour produire des phénotypes hétérotiques est donc de plus en plus admis par la communauté scientifique.

1.1.4 Comment mesurer l'état de santé de la plante : cas de l'efficience photosynthétique

Le besoin d'identifier des marqueurs répétables et informatifs pour établir un diagnostic de l'état de santé de la plante est fondamental. Pour les agronomes par exemple, pouvoir disposer d'outils qui permettent une mesure directe ou indirecte de la réaction de la plante aux conditions environnementales et aux pratiques culturales est une nécessité. Il existe malheureusement peu d'outils fiables. Nous en décrivons deux ici. Les mesures d'échanges gazeux et de fluorescence chlorophyllienne sont réalisées afin de caractériser l'activité photosynthétique des plantes et de mettre en évidence les effets possibles des stress biotiques et abiotiques

1.1.4.1 Mesure des échanges gazeux

Les mesures d'échanges gazeux foliaires sont effectuées grâce à un analyseur à gaz infra-rouge de type LI-COR (Biosciences, Lincoln, Nebraska). Cet appareil permet de mesurer la photosynthèse nette exprimée en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ qui équivaut à l'assimilation du CO_2 dans le cycle de Calvin (Von Caemmerer et Farquhar, 1981). Elle caractérise donc l'efficience de la phase obscure de la photosynthèse. La mesure avec ce même appareil de la conductance stomatique, de la concentration intracellulaire du CO_2 et de la transpiration permet de déterminer si une baisse de la photosynthèse nette provient d'une limitation stomatique ou à des variations du métabolisme photosynthétique. En effet, la diminution de la photosynthèse peut être occasionnée par une réduction de la pénétration en CO_2 , limitée par une fermeture des stomates : c'est la notion de limitation stomatique (Farquhar and Sharkey, 1982) et provoquer une diminution de la concentration interne en CO_2 et ainsi une réduction de la photosynthèse nette (Farquhar and Sharkey, 1982). Les mesures d'échanges gazeux sont utilisées dans de nombreuses études afin d'étudier l'impact de stress biotiques et abiotiques sur la photosynthèse. Néanmoins, l'utilisation de cet appareil est coûteuse, contraignante sur le terrain et la prise de mesure très longue.

1.1.4.2 Mesure indirecte de l'efficacité de la chaîne photosynthétique de transport d'électron et du PSII avec le Handy PEA



Fig. 4: Présentation du Handy PEA. (A) : Unité de contrôle du Handy PEA, (B) : capteur, (C) : Pince, (D) : Cordon se connectant sur l'unité de contrôle (d'après Hansatech Instruments 206)

Une mesure indirecte de l'efficacité de la chaîne photosynthétique de transport d'électrons et du photosystème II (PSII) peut être effectuée en mesurant la fluorescence de la chlorophylle *a*. Elle donne des indications indirectes sur l'état physiologique de la feuille. Cette mesure peut être effectuée par le fluorimètre Handy PEA (Handy-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) (Fig. 4). Les feuilles mises préalablement à l'obscurité pendant 20 minutes sont éclairées par un flash lumineux d'une seconde et d'une intensité maximale de 3000 PAR. Les changements de l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle *a* ainsi induits sont appelés la fluorescence stationnaire (Stirbet and Govindjee, 2011). La fluorescence stationnaire est analysée en utilisant le test JIP développé par (Strasser et Strasser, 1995). Le test JIP évalue l'équilibre entre l'énergie totale entrante et sortante et fournit la distribution probable de l'énergie absorbée (ABS) entre les événements : Piégeage (TR), transport d'électron (ET) et dissipation (DI) (Kalaji *et al.*, 2016) (Fig. 5)

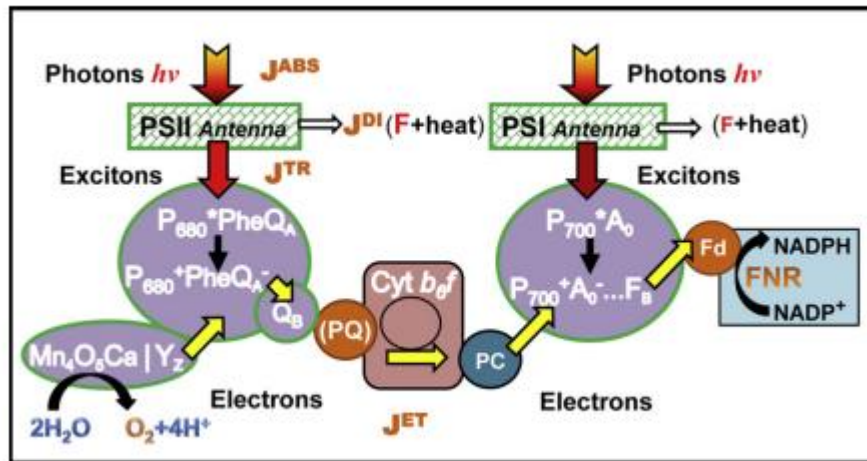


Fig. 5: Représentation schématique de la principale voie de l'énergie en lien avec la fluorescence de la chlorophylle a . JABS représente le taux d'absorption de photons par les pigments des antennes du photosystème II (PSII) ; JDI représente la part des photons absorbés dissipés par fluorescence (F) ou chaleur (Heat) ; JTR représente le taux d'excitons piégés par le centre de réaction du PSII P_{680} ; JET représente le taux d'électrons transportés de H_2O jusqu'à Fd (d'après Stirbet et Govindjee, 2011)

La mesure de la fluorescence de la chlorophylle a est un très bon marqueur de l'état physiologique des feuilles et de la performance de la plante sous différents stress biotiques et abiotiques. De plus, la mesure de la fluorescence de la chlorophylle a par le Handy PEA est rapide, peu coûteuse et très facile à utiliser sur le terrain. Ainsi elle a été utilisée dans de nombreuses études dans des contextes très variés (Baker and Rosenqvist, 2004). Cette mesure a été utilisée afin de caractériser l'impact d'un stress hydrique sur la chaîne photosynthétique de transport d'électrons chez la tomate (Ripoll, Urban and Bertin, 2016). Correia *et al.* (2005) ont montré l'effet d'un excès d'UV-B et d'une déficience en azote sur le nombre d'accepteurs d'électrons disponibles au niveau du PSII. Guha, Sengupta et Reddy. (2013) ont associé des mesures d'échanges gazeux avec le LI-COR et des mesures de fluorescence de la chlorophylle a afin d'étudier l'impact de la sécheresse sur la photosynthèse chez la mûre. Redillas *et al.* (2011) et Li *et al.* (2012) étudièrent l'impact d'une déficience en azote sur le riz et le maïs respectivement. Le Handy-PEA peut également être utilisé pour caractériser l'impact d'un stress biotique. Júnior *et al.* (2015) ont montré une diminution de l'efficacité du photosystème II sur des plants de cafés inoculés avec *H.vastatrix* traités ou non avec des fongicides. Enfin, le suivi de la fluorescence de la chlorophylle a par le Handy PEA peut permettre d'identifier des marqueurs permettant de détecter précocement la présence d'une maladie. Christen *et al.* (2007) ont montré que certains paramètres pourraient être des marqueurs précoces de la présence de 'l'ESCA' chez la vigne.

Parmi les nombreux paramètres calculés par le Handy PEA, l'index de performance (PI) de (Strasser *et al.*, 2004) est considéré comme un très bon indicateur de la vitalité de la plante et constitue le paramètre le plus utilisé (Silvestre *et al.*, 2014). Ce paramètre reflète le potentiel de la plante à conserver l'énergie captée de l'exciton jusqu'aux accepteurs du Photosystème I. C'est en réalité une combinaison de 4 paramètres caractérisant chacun une composante différente de la chaîne photosynthétique : (i) RC/ABS représente la densité des centres de réaction ouverts, c'est à dire le taux de quinone A capables d'accepter un électron ; (ii) FV/F0 représente la performance due au taux de piégeage de photons ; (iii) (1-VJ)/VJ représente la performance due à la conversion d'énergie d'excitation dans la chaîne de transport d'électrons ; (iv) $\delta RE1o$ représente l'efficacité avec laquelle un électron peut arriver à l'accepteur final du photosystème I (Strasser *et al.* 2004).

Néanmoins Ripoll *et al.* (2016) attirent l'attention des utilisateurs sur le fait que le PI n'est pas toujours aussi facilement interprétable qu'on le pense. Ils citent un exemple dans un contexte de stress hydrique dans lequel le PI allait à l'encontre de l'interprétation bâtie avec l'ensemble des autres paramètres. Ils recommandent ainsi aux utilisateurs de ne pas se limiter à l'étude de cet index de performance.

Pour faire un diagnostic complet de l'efficacité photosynthétique, il semble important d'associer la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* par le Handy PEA qui reflète l'efficacité de la phase claire de la photosynthèse avec des mesures d'échanges gazeux effectués avec un analyseur à gaz infra-rouge de type LI-COR indiquant l'efficacité de la phase obscure de la photosynthèse. Néanmoins, le Handy PEA de par sa petite taille, la rapidité des mesures et son faible coût paraît très intéressant dans une démarche de screening.

1.2 Présentation du modèle d'étude hôte-parasite : le couple *H. vastatrix*/*C. arabica*

1.2.1 Le modèle café

1.2.1.1 Le genre *Coffea*

Coffea est un genre qui comprend plus de 120 espèces et appartient à un des 500 genres inclus dans la famille des rubiacées. Les rubiacées constituent la 4^{ème} plus grande famille des angiospermes et comporte plus de 13 000 espèces. Cette famille appartient à l'ordre des Gentianales qui a divergé des Asterides il y a environ 87 millions d'années et des Rosides il y a 120 millions d'années (Wikström *et al.*, 2015).

Historiquement, en se basant sur des données morphologiques, les espèces appartenant au genre *Coffea* ont été divisées par Chevalier (1947) en quatre groupes : *Eucoffea* K.Schum. (Vrai caféier), *Mascaracoffea* I chev. (faible teneur en caféine), *Argocoffea* Pierre et *Paracoffea* Miq (représenté par le genre *Psilanthus* Hook). Les trois premiers groupes contiennent des caféiers exclusivement originaires d'Afrique tandis que la plupart des accessions du quatrième groupe sont originaires d'Inde, d'Indochine, de Ceylan et de Malaisie. Depuis les années 1980, des progrès ont été faits en taxonomie et cette classification a été revue en associant des données moléculaires et des données morphologiques. La section *Argocoffea* a été exclue du genre *Coffea*. Davis *et al.* (2006) proposent une nouvelle classification qui sépare le genre *Coffea* en deux sous genres : le sous genre *Coffea* contenant 95 espèces et le sous genre *Baracoffea* contenant 8 espèces. Le sous genre *Baracoffea* est restreint aux forêts saisonnièrement sèches à feuilles caduques et aux brousses situées à l'ouest de Madagascar, dans le nord-est du Kenya et dans le sud-est de la Somalie. Le sous genre *Coffea* est, quant à lui, présent dans les forêts humides à feuilles persistantes où l'on retrouve les trois espèces cultivées pour la production de café, *C. arabica*, *C. canephora* et *C. liberica* (Maurin *et al.*, 2007). Davis. (2011) incluent les espèces classées dans le genre *Psilanthus* au genre *Coffea* faisant de *Psilanthus* un sous-groupe de *Coffea* amenant à 124 le nombre d'espèces appartenant à *Coffea*. Le genre *Coffea* peut être caractérisé par une unique synapomorphie : la présence de grains de café (graines avec une rainure profonde sur la surface ventrale (plate), la rainure est invaginée au sein de la graine et apparaît courbée en section transversale.

1.2.1.2 Les espèces cultivées

Le genre *Coffea* rassemble 124 espèces mais seulement deux espèces sont commercialisées à une échelle mondiale : *C. arabica* et *C. canephora* qui représentent respectivement 65% et 35 % de la production mondiale (Wintgens, 2012). *C. arabica* représente le café gourmet et constitue l'unique espèce allotetraploïde appartenant au genre *Coffea*.

1.2.1.3 Importance économique et sociale du café en Amérique du sud et en Amérique centrale

Le café est un produit de consommation de masse. Au sortir de la seconde guerre mondiale, il représentait après le pétrole, la principale matière première commercialisée (Daviron et Ponte., 2005). En 2015/2016, 155 469 milliers de sacs de 60 kg ont été consommés dans le monde et cette consommation croît à un taux annuel d'environ 2% par an.

Les pays du sud fournissent plus de 90 % de la production mondiale de café alors que ceux du nord en sont les principaux consommateurs. Le café représente une part importante des recettes d'exportation d'un certain nombre de pays à faible revenu, y compris ceux qui participent à un moindre degré au marché international d'exportation (Daviron et Ponte., 2005). Ainsi, même si le caféier n'est pas une culture vivrière, les revenus de millions de personnes et la balance commerciale de nombreux pays du sud dépendent des exportations de café vers les pays consommateurs du nord (Charrier *et al.*, 2012).

1.2.1.4 Origine de *Coffea arabica*

Depuis son origine en Afrique jusqu'aux zones de cultures actuelles situées principalement en Amérique du sud, un goulot d'étranglement conséquent a opéré. Le centre d'origine de *C. arabica* se situe entre les hauts plateaux du sud-ouest de l'Éthiopie et le plateau de Boma au Soudan. Au 14^{ème} siècle, les musulmans transportèrent des graines vers la péninsule Arabique et le Yémen qui furent le théâtre de la domestication, culture et commercialisation de *C. arabica*. Le nom commun café dériverait de « qahwah » signifiant vin en arabe. Durant le 17^{ème} siècle, la culture fut introduite en Inde. En 1706, une plante fut transportée vers le jardin botanique d'Amsterdam et en 1827, quelques graines furent prélevées et introduites au Brésil et plus tard dans d'autres pays d'Amérique du sud. *C. arabica* var *Typica* fut le premier cultivar à partir duquel la première plantation fut plantée. Entre 1860 et 1870, des graines de *C. arabica* var. Bourbon issue de l'île de la Réunion furent

utilisées pour établir de nouvelles plantations au Brésil (Robbrecht, 1995). L'histoire de l'Arabica a engendré une faible diversité génétique augmentant les prédispositions aux stress biotiques et abiotiques. La dernière étude de diversité sur des plants d'Arabica sauvages et cultivés (Klein *et al.*, 2017 en préparation) montre une faible diversité sur les 699 accessions collectées en Ethiopie et les 95 accessions collectées au Yemen. La très faible diversité génétique des variétés cultivées utilisées aujourd'hui, la haute sensibilité des plantations aux maladie et le réchauffement climatique représentent un challenge majeur pour la production de café dans les prochaines années (Ghini, Bettioli et Hamada, 2011; Lin, 2011).

1.2.1.5 Caractéristique du génome et diversité

Les espèces appartenant au genre *Coffea* sont toutes diploïdes ($2n=2x=11$) à l'exception de *C. arabica* qui est tétraploïde ($2n=4x=44$). *C. arabica* serait le résultat d'une hybridation spontanée entre deux espèces diploïdes sauvages *C. eugenoides* d'une part et *C. canephora* d'autre part ayant eu lieu récemment à l'échelle de l'évolution (10 000-450 000 ans). A part *C. arabica*, *C. heterocalyx* et *C. anthonyi*, les autres espèces ont une auto-incompatibilité gamétophytiques (Cenci, Combes et Lashermes, 2012). Une étude plus approfondie appuyée sur des analyses RFLP et GISH a permis de démontrer la présence de deux lots de chromosomes Ea et Ca, qui proviendraient de formes ancestrales des espèces actuelles *C. eugenoides* (parent femelle, génome Ea) et *C. canephora* (parent mâle, génome Ca) ou d'écotypes proches de ces espèces diploïdes (Raina, Mukai and Yamamoto, 1998; Lashermes *et al.*, 1999)(Fig. 6).

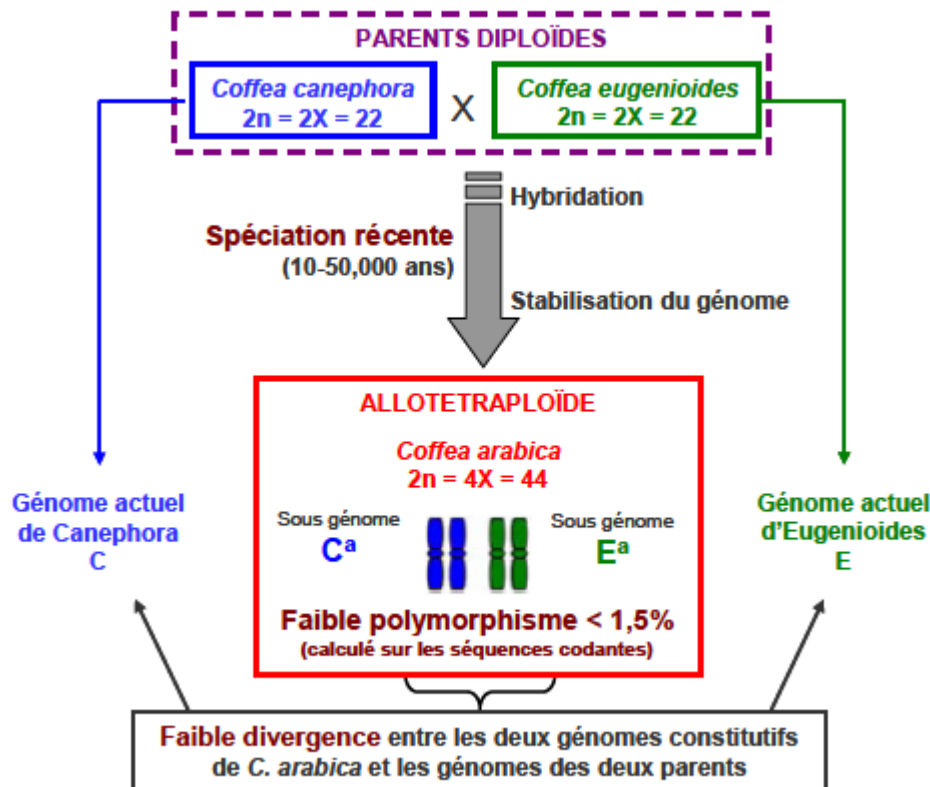


Fig. 6: Formation de l'allotétraploïde *C. arabica* (d'après Lashermes *et al.*, 1999)

Chez *C. arabica*, il a été observé un mode d'hérédité de type disomique par analyse des ségrégations au sein d'une population F2. *C. arabica* possède un comportement méiotique comparable à celui des espèces diploïdes. A la méiose, les chromosomes homologues s'appariaient de façon systématique pour former des bivalents. Aucun des chromosomes homéologues de *C. arabica* ne s'apparie et cela est probablement dû au fonctionnement de facteurs génétiques régulant l'appariement (Lashermes *et al.*, 2000). La cytométrie en flux a été utilisée pour estimer la quantité d'ADN nucléaire chez une quinzaine d'espèces de *Coffea* originaires d'Afrique (Cros *et al.*, 1995). Chez les espèces diploïdes, les quantités en 2C d'ADN nucléaire sont très variables avec des valeurs comprises entre 0,95 et 1,78 pg par noyau. Ces variations observées seraient dues aux variations du nombre de copies de séquences d'ADN répétées (Lashermes, Andrade and Etienne, 2008). En ce qui concerne le tétraploïde, *C. arabica*, sa quantité d'ADN a été estimée deux fois supérieure (2,61 pg) aux quantités des espèces diploïdes (Cros *et al.*, 1998). Comparé aux autres espèces de plantes, le génome des caféiers apparaît relativement de petite taille (Anthony et Lashermes, 2006).

1.2.1.6 Les variétés d'Arabica cultivées

1.2.1.6.1 Les variétés lignées

Coffea arabica est une espèce allotétraploïde. Pendant longtemps les agronomes ont distingué deux formes cultivées: La population Typica et la population Bourbon (Van Der Vossen *et al.*, 2015). La population Typica a été introduite au Brésil, en provenance de la Guyane française au début du XVII^{ème} siècle. La population Bourbon est considérée comme un mutant récessif originaire de l'île de la Réunion. Sa caractéristique est d'être d'un format plus réduit mais d'une végétation plus dense que le caféier Typica et a généralement une meilleure productivité ainsi qu'une meilleure qualité à la tasse (Coste., 1989). Parmi les nombreuses variétés présentes au sein de *C. arabica*, à l'heure actuelle, Caturra et les variétés dérivées (Mundo novo et Catuai) représentent 80 % du verger et sont une référence en terme de qualité à la tasse. La variété Caturra est originaire d'une mutation au sein de la population Bourbon. Le croisement naturel entre Bourbon et Typica donna le cultivar vigoureux et productif « Mundo Novo » au Brésil. Le croisement entre Mundo novo et Caturra permet d'obtenir une variété de port nain particulièrement bien adaptée aux conditions brésiliennes : le Catuai. Le port ramifié bas des variétés Catuai et Caturra (basé sur un seul gène de nanisme) permet une intensification et une mécanisation de la récolte et d'adopter les nouvelles pratiques culturales de la Révolution Verte qui a vu le jour en caféiculture dans les années 1950-60 (Bertrand *et al.*, 2012).

1.2.1.6.2 Les hybrides F1

Depuis les années 1990, la demande des consommateurs s'est orientée vers un café de haute qualité avec notamment l'émergence de cafés différenciés suivant les origines géographiques ou les terroirs et/ou suivant le mode de production ou de commercialisation (équitable, bio ...etc) et/ou pour leur qualité intrinsèque. Néanmoins, le réchauffement climatique actuel entraîne une augmentation des inondations, sécheresses et gelées et fragilise la production créant des déséquilibres entre l'offre et la demande. Les programmes de sélection jusqu'alors centrés principalement sur le rendement changent leurs objectifs au profit d'une sélection pour un ensemble complexe de caractères comme la productivité associée à une meilleure qualité et une résistance aux stress biotiques et abiotiques (Bertrand *et al.*, 2012). Afin d'atteindre ces objectifs, certains chercheurs ont proposé de créer des hybrides F1 interspécifiques notamment en croisant du matériel Ethiopien avec des variétés cultivées (Van der Vossen, 2001). Les hybrides F1 ont été largement utilisés chez les plantes allogames depuis les années 1930 du fait de leur hétérosis, *i.e* leur performance supérieure comparée aux

parents dans certains caractères tels que le taux de croissance, la résistance aux stress biotiques et abiotiques et le rendement (Duvick, 2001). Chez les plantes autogames, l'utilisation des hybrides F1 était moins fréquente du fait du faible degré d'hétérosis (cf paragraphe 1.1.3.2.1). L'avantage des hybrides F1, pour l'espèce autogame Arabica a été démontré pour la première fois dans le programme de breeding kenyan (Van Der Vossen *et al.*, 2015). Bertrand *et al.* 2005 ont évalué l'hétérosis des hybrides F1 issus de croisements entre des cultivars sauvages soudanais-ethiopien et des cultivars américains entre 22 et 47%. Ils concluent dans une étude ultérieure que l'hétérosis confère aux hybrides F1 un avantage par rapport aux variétés lignées à la fois en termes de productivité sans augmenter les intrants mais aussi en termes de stabilité de rendement du fait de leur homéostasie (Bertrand *et al.*, 2011). Les hybrides F1 font l'objet d'une sélection individuelle (clone d'hybride F1) et sont ensuite propagés végétativement en conditions *in vitro* par embryogénèse somatique.

1.2.1.6.3 L'utilisation de la vigueur hybride chez les autogames allopolyploïdes : le cas de l'Arabica

Chez les autogames, la création de variétés hybrides se justifie moins que chez les allogames. En effet, la génétique quantitative basée sur la génétique mendélienne démontre que l'hétérosis est 'fixable' (c'est à dire que la dominance des gènes favorables se manifeste à l'état homozygote). Dans cette situation les variétés hybrides sont seulement un moyen plus rapide et plus commode que la création de variétés lignées pour accumuler dans un même génotype le maximum de gènes dominants favorables.

A l'aune de la génétique quantitative mendélienne, la création de variétés hybrides serait peu recommandable chez une espèce allopolyploïde. En effet les allopolyploïdes sont par nécessité autogames dès leur création. C'est même une condition *sine quae non* pour fixer une nouvelle espèce qui se distinguera dans sa descendance des deux espèces parentales.

Quand un hybride subit un doublement chromosomique après sa formation, cela peut aboutir à un nouveau génome allopolyploïde qui ne peut devenir stable que si son système de reproduction est l'autogamie.

Pour être ensuite sélectionné comme nouvelle espèce cet individu doit présenter des performances exceptionnelles et sans aucun doute identiques ou supérieures à celles de ses deux parents dans leur milieu de naissance. En conséquence, seuls les plus performants des allopolyploïdes subsistent et ce sont ceux qui ont montré une excellente valeur sélective. De façon générale les allopolyploïdes sont donc autogames, ont fixé l'hétérosis et sont plus

stables que leurs parents. C'est ce qui a été observé chez l'Arabica (Bardil *et al.*, 2011; Bertrand *et al.*, 2015).

Par ailleurs, ces espèces sont en général nées d'un seul événement de spéciation. La diversité génétique initiale ne peut donc être que très faible si on la compare à celles des espèces diploïdes allogames qui leur donnent naissance surtout si l'événement de spéciation est récent. C'est le cas du caféier Arabica. Par conséquent chez cette espèce, seul le recours à l'épigénétique permet théoriquement de donner une base de compréhension satisfaisante au fait que les variétés hybrides sont supérieures aux variétés lignées.

1.2.2 La rouille orangée

1.2.2.1 Apparition et extension

Deux principales maladies limitent la production de café : la rouille orangée et l'anthracnose des fruits (Herrera P. *et al.*, 2008). La rouille orangée, présente dans presque tous les pays producteurs de café (Rozo *et al.*, 2012), est considérée comme la maladie la plus dévastatrice pour cette culture (Romero *et al.*, 2014). Parmi les espèces cultivées, *C. arabica* est la plus sévèrement atteinte avec des pertes allant jusqu'à 30 % pour les variétés sensibles si la maladie n'est pas contrôlée (Rozo *et al.*, 2012).



Fig. 7: Symptômes causés par la rouille orangée sur *C. arabica*. A. Défoliation importante d'un arbre sensible B et C. Développement des urédospores sur la face inférieure de la feuille.

La rouille orangée a été découverte en 1861 à côté du lac Victoria (Afrique de l'est) sur des espèces sauvages de *Coffea* et a été décrite comme causée par *H.vastatrix* par Berkeley et Broome en 1869. En 1888, la rouille orangée causa la destruction de la production de café de Ceylan (actuel Sri Lanka), le plus grand producteur à l'époque. Quelques années plus tard, la rouille orangée se propagea en Asie et en Afrique. La rouille orangée a atteint le Brésil en 1970 avant de se répandre dans tous les pays producteurs d'Amérique centrale et d'Amérique du sud (McCook et Vandermeer, 2015)

1.2.2.2 Taxonomie

Le genre *Hemileia* appartient au phylum Basidiomycota, classe Pucciniomycetes et à l'ordre des Pucciniales, le plus grand groupe des champignons pathogènes de plantes. Il comprend 42 espèces présentes principalement dans les régions tropicales et sub-tropicales d'Afrique et d'Asie, principalement sur les Rubiacées non cultivées et les Apocynacées (Talhinhas *et al.*, 2017). Deux rouilles ont *C. arabica* comme hôte : *Hemileia vastatrix* et *Hemileia coffeicola*. *H.vastatrix* se distingue de *H. coffeicola* par le fait qu'elle produit des sori formant des tâches aux contours bien définis et présente des urediniospores présentant davantage d'ornementations en épine mais moins bien individualisées. *H. coffeicola* a une très faible importance économique et est confinée géographiquement (Coste *et al.*, 1989).

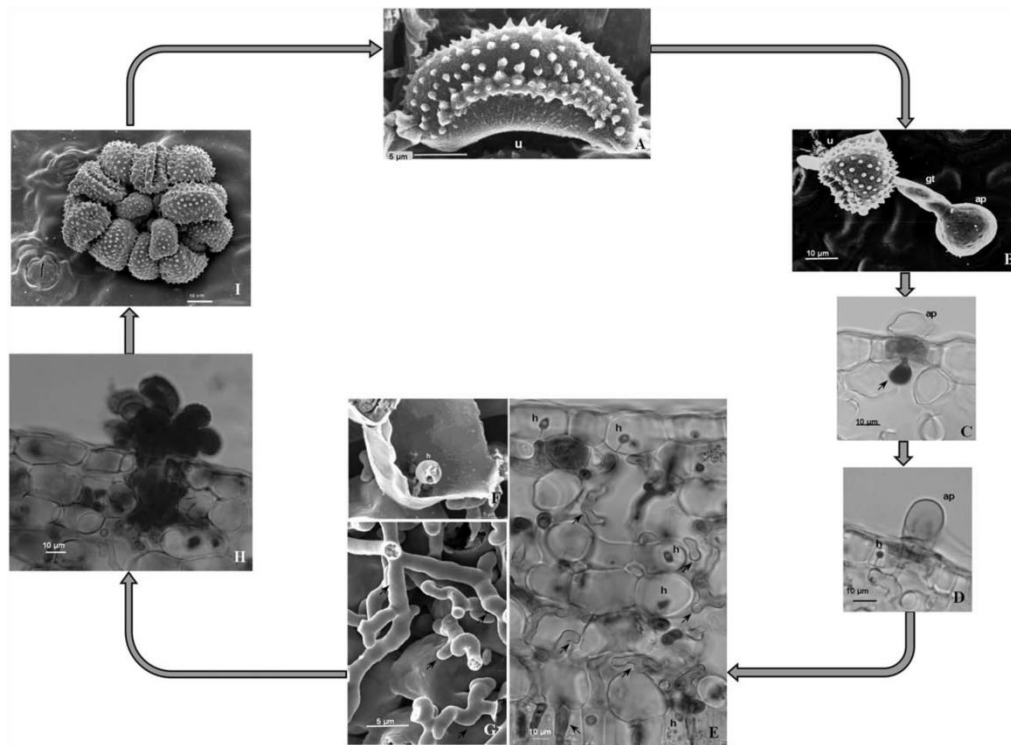
1.2.2.3 Biologie de *H.vastatrix*

Fig. 8: Processus d'infection d'*Hemileia vastatrix*. (A) Urediniospore (u), Microscopie électronique à balayage. (B) Urediniospore germée (u) avec tube germinatif (gt) et appressorium (ap) sur un stomate sur la face inférieure de la feuille, 17 h après inoculation (hai), microscopie électronique à balayage. (C) Appressorium (ap) sur un stomate et hyphes de pénétration (flèche), 24 hai, microscopie optique. (D) Appressorium (ap) sur un stomate et hyphes intercellulaires avec un haustorium (h) dans une cellule subsidiaire, 48 hai, microscopie optique. (E) Hyphes intercellulaires (flèche) et haustoria (h) à l'intérieur des cellules de l'épiderme et du mésophylle, 20 jours après inoculation, microscopie optique. (F) Haustorium (h) dans une cellule du parenchyme lacuneux, 20 jours après inoculation, microscopie électronique à balayage. (G) Hyphes intercellulaires (flèche) dans le parenchyme lacuneux, 20 jours après inoculation, microscopie électronique à balayage. (H) Sores uredosporiques sortant du stomate sous dorme de bouquet, 21 jours après inoculation, microscopie optique. (I) Sores uredosporiques, 21 jours après inoculation, microscopie électronique à balayage. (D'après Talhinhos *et al.*, 2017)

Le basydiomycète *Hemileia vastatrix* est un parasite obligatoire qui affecte les feuilles vivantes et produit sur la face inférieure des pustules sporogènes (sores) qui forment des petits points de coloration jaune évoluant rapidement en grandes lésions de quelques centimètres de diamètre de couleur orangée. Le champignon provoque la réduction de l'aire photosynthétique ce qui conduit à une défoliation qui, quand elle est aigüe, peut conduire à la mort des branches et à de forte perte de rendement (Eskes., 1989). Ce basidiomycète peut produire 5 types de spores : basidiospores, pycniospores, aeciospores, urediniospores et teliospores (Fig. 8). Cependant, la forme d'infection d' *H.vastatrix* est l' urediniospore

(Fernandez, Talhinhos and Duplessis, 2013). Lorsque les conditions sont réunies, ces spores germent et produisent un tube germinatif qui se développe jusqu'à rencontrer un stomate sur lequel un appressorium se différencie. Dès 24h après pénétration, un hyphe de pénétration se forme dans le stomate et se développe dans la chambre sous-stomatique. Après contact avec les cellules du mésophylle, cet hyphe produit 2 branches latérales à son extrémité. Chacune des branches latérales porte une cellule mère d'haustorium dont la formation commence environ 48h après inoculation. A partir des cellules mères d'haustorium, des haustoria sont produits dans les cellules du stomate. La poursuite de la croissance du champignon se fait par le développement d'hyphes intercellulaires et la différenciation d'un haustorium dans les cellules du mésophylle. Environ 20 jours après inoculation, un mycelium dense apparaît au-dessous du secteur de pénétration et les sores uredosporiques sortent comme des 'bouquets' par les stomates de la face inférieure des feuilles (Silva *et al.*, 2006). La formation d'un haustorium est caractéristique de la biotrophie, il est considéré comme une structure d'alimentation mais joue aussi un rôle dans la suppression de réponse de défense de l'hôte et la reprogrammation du métabolisme de l'hôte (Ramiro *et al.*, 2009). La rouille orangée est polycyclique, ce qui signifie que plusieurs cycles ont lieu durant la saison (Varzea et Marques, 2005).

1.2.2.4 Impact du changement climatique sur les récentes épidémies

D'après l'ICO (International Coffee Organization), l'épidémie de rouille orangée touchant actuellement l'Amérique centrale et la Colombie est la pire épidémie depuis l'apparition de cette maladie en Amérique centrale en 1976 et a conduit certains pays affectés à déclarer une urgence phytosanitaire et donc à adopter des mesures à l'échelle nationale pour combattre la rouille orangée.

Avant 2008, les épidémies de rouille orangée étaient considérées comme contrôlables par une prophylaxie bien maîtrisée (alternance de cuivre et de triazoles). Bien que la plupart des variétés cultivées aient été sensibles, les dommages causés par la rouille étaient limités, particulièrement à basse altitude. En effet, les dégâts occasionnés étaient principalement sous forme de pertes secondaires (pertes causées par l'épidémie en cours sur la productivité de l'année suivante), les pertes primaires étant limitées. Le pic d'épidémie arrivait à la fin de la récolte, ce qui entraînait une perte de vigueur des branches fructifiées donc une baisse de la récolte l'année suivante alors que la récolte en cours n'était presque pas affectée. Le

caféiculteur s'attendant dans tous les cas à un faible rendement l'année suivant un rendement important, les pertes secondaires du fait du pathogène étaient masquées (Avelino *et al.*, 2015).

De 2008 à 2013 une vague d'épidémie sévit en Mésio-Amerique de la Colombie au Mexique incluant le Pérou, l'Equateur et quelques pays des caraïbes (Avelino *et al.*, 2015). L'incidence de la maladie est passée de moins de 5 % avant 2008 à plus de 40 % en Colombie (Rozo *et al.*, 2012) et a causé une diminution marquée de la production de café d'en moyenne 31% et 16% en Colombie et en Amérique centrale respectivement. Les agriculteurs étant très dépendants des revenus issus de la caféiculture, les épidémies de rouille en Colombie et Amérique centrale ont eu un très fort impact social et ont conduit à d'importants problèmes de sécurité alimentaire (Avelino *et al.*, 2015). Lors de ces récentes épidémies, l'infestation a atteint un niveau important plus tôt dans la saison causant la mort prématurée des branches et la perte des fruits qu'elles portent entraînant ainsi des pertes primaires élevées contrairement aux épidémies précédentes. Ce changement pourrait être dû à l'émergence de nouvelles races de pathogène. Avelino *et al.* (2015) réfute cette hypothèse et propose que les récentes épidémies ne soient pas dues à un phénomène de contournement des résistances mais que les nouvelles races identifiées soient au contraire la conséquence de ces sévères épidémies. En effet, une épidémie importante implique une grande population de pathogène et de nombreux événements de multiplication, ce qui par conséquent favorise les événements de mutations et donc la probabilité d'avoir de nouvelles races. Le fait que ces nouvelles races ne soient pas nécessairement plus agressives que la race II corrobore cette hypothèse. L'étude de Rozo *et al.* (2012) visant à évaluer la diversité et l'agressivité du pathogène dans différentes régions de Colombie avant et après 2008, année de la sévère épidémie conforte cette hypothèse. En effet, les isolats collectés avant et après l'épidémie sont similaires à la fois génétiquement et de par leur agressivité. Le fait que la majorité du verger soit constitué d'hôtes susceptibles, la petite taille des exploitations (moins de 1,5 ha en moyenne), l'âge variable des caféiers d'une même parcelle et la proximité d'autres systèmes agro écologiques comme les forêts sont autant d'éléments constituant une barrière spatiale et temporaire aux attaques par de nouvelles races de rouille et expliquant ainsi ce non contournement (Rozo *et al.*, 2012).

Ecartant l'hypothèse de l'émergence de nouvelles races de pathogène, Avelino *et al.* (2015) attribuent les récentes épidémies à une combinaison de facteurs :

- La composition du Verger constitué en majorité de variétés sensibles et âgées.
- Les anomalies météorologiques : le principal facteur est la diminution de l'écart des températures jour/nuit. Cette réduction entraine probablement l'augmentation du

nombre de jours pour lesquels la température est favorable au développement de la rouille (21-25 °C pour la germination et 22-28 °C pour la période de latence). Ainsi, la période de latence de la maladie est probablement fortement raccourcie. La distribution des précipitations (arrivée précoce de la saison des pluies et temps pluvieux par intermittence) et l'augmentation de la force du vent (moyen efficace de dispersion des spores sèches) ont également participé à favoriser ces épidémies.

- les conditions économiques qui ont un effet direct sur le management des vergers : le prix du café ayant baissé, la gestion des vergers était sous-optimale pendant les épidémies du aux difficultés économiques auxquelles les caféiculteurs faisaient face à cette période. En effet, une étude conduite au Nicaragua en 2014 à Jinotega et Matagalpa, deux régions caféières très impactées par la rouille en 2012 a montré que les caféiculteurs suivant un itinéraire de culture strict et systématique incluant une application correcte de fertilisants et de fongicides n'ont pas observé d'importantes attaques de rouille orangée (Avelino *et al.*, 2015).

Un changement des conditions météorologiques a eu un fort impact sur ces récentes épidémies. Les prévisions météorologiques pour les prochaines années ayant des caractéristiques communes avec les conditions régnant lors des épidémies en Colombie et en Amérique centrale, le signal d'alarme est tiré. Comme vu précédemment, ce changement climatique favorise l'épidémie en agissant sur deux leviers: en favorisant le développement du pathogène mais aussi en modifiant l'état physiologique de la plante en introduisant des stress plus importants.

1.2.2.5 La lutte génétique contre la rouille

1.2.2.5.1 Perspective historique

La première trace de lutte génétique remonte en Inde en 1911 et donna lieu à la diffusion du cultivar résistant Kent (Rodrigues *et al.*, 1975). Dans les années 1950, suite à l'arrivée de la rouille orangée sur le continent américain, les gouvernements américains et portugais financent la création du centre de recherche sur la rouille du caféier (CIFC, Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeiro) au Portugal. Ce centre permet la centralisation de la recherche sur la rouille orangée à un niveau international loin des régions de culture (quarantaine). La démonstration que toutes les variétés cultivées à l'époque sur le continent Américain étaient sensibles à la rouille orangée fut un des premiers résultats émanant de la recherche dans ce centre. En 1955, des graines de l'hybride spontané entre *C. arabica* et

C.canephora nommé « hybride de Timor » car découvert en 1927 sur l'île de Timor, furent envoyées au CIFC et décrites comme très résistantes à toutes les races de rouille connues à l'époque. En 1960, le CIFC initia un programme de sélection visant à transférer la résistance de l'hybride de Timor aux principales variétés cultivées d'Arabica. Cet hybride fût ainsi par la suite à l'origine des programmes d'amélioration des Arabicas à la rouille orangée dans le monde. L'exploitation de la résistance de l'hybride de Timor, en croisement avec des variétés commerciales sensibles à la rouille a abouti à l'obtention de variétés résistantes mises à la disposition des producteurs. Il s'agit principalement des Catimors et Sarchimors. Ces populations combinent la résistance de l'hybride de Timor et les qualités agronomiques des variétés commerciales atteignant des niveaux similaires en termes de qualité à la tasse que les génotypes purs Arabica (Talhinhas *et al.*, 2017).

1.2.2.5.2 Résistance spécifique et résistance non spécifique

Il existe deux types de résistances : la résistance spécifique appelée ETI (« Effector-Triggered Immunity » ou immunité médiée par l'effecteur) comme celle présente chez l'hybride de Timor et la résistance non spécifique appelée PTI ("PAMP-Triggered Immunity" ou Immunité médiée par les PAMPs).

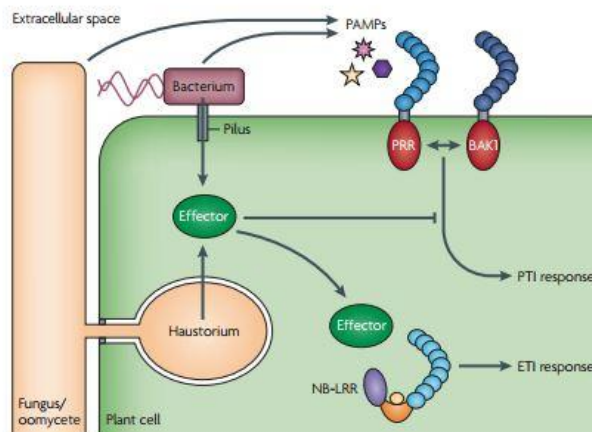


Fig. 9: Principes de l'immunité chez les plantes. Les pathogènes de plante de type bactérien se propagent exclusivement dans l'espace extracellulaire. La plupart des champignons et oomycètes étendent également leur hyphes dans cet espace même si beaucoup forment également des structures permettant de prélever des nutriments appelées haustoria qui pénètrent dans la paroi mais pas dans la membrane plasmique. D'autres champignons étendent leurs hyphes dans la cellule mais ne cassent pas la membrane plasmique. Les molécules libérées dans l'espace extracellulaire telles que les lipopolysaccharides, flageline et chitine ("Pathogen-Associated Molecular Patterns" (PAMP) sont reconnus par les PRR (« Plant pattern Recognition Receptors ») et déclenchent la PTI ("PAMP-Triggered Immunity" ou Immunité médiée par les PAMP). Les PRR consistent généralement en un domaine récepteur extracellulaire riche en leucine (LRR) (bleu) et un récepteur kinase transmembranaire (rouge).

Beaucoup de PRR interagissent avec la protéine bak1 (« BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1 ») pour débiter la signalisation de la PTI. Les bactéries libèrent des effecteurs dans la cellule par un système de sécrétion de type 3 alors que les champignons et oomycètes libèrent des effecteurs par le biais de l'haustoria ou d'autres structures intracellulaires par un mécanisme inconnu. Ces effecteurs intracellulaires interviennent dans la suppression de la PTI. Néanmoins, beaucoup sont reconnus par un récepteur de type NB-LRR qui induit l'ETI (« Effector-Triggered Immunity » l'immunité médiée par l'effecteur). Les protéines NB-LRR consistent en un domaine LRR (bleu clair), un domaine central NB (croissant orange) qui se lie à l'ATP ou à l'ADP (ovale jaune) ainsi qu'un domaine TIR « Toll-interleukin 1 receptor » ou un domaine CC « coiled-coil » (ovale violet) (d'après Dodds et Rathjen, 2010).

1.2.2.5.3 Les réponses de défenses spécifiques

La résistance spécifique appelée ETI (« Effector-Triggered Immunity » ou 'immunité médiée par l'effecteur) est basée sur la reconnaissance de protéines sécrétées par l'agent pathogène : les effecteurs. La mise en place de l'ETI dépend de la présence simultanée du gène *R* chez la plante et du gène *Avr* chez le pathogène selon le modèle « gène pour gène » établi par Flor dans les années 50. Les gènes *R* et *Avr* sont généralement polymorphes et ne sont pas présents ou fonctionnels chez toutes les variétés d'une plante et toutes les souches d'un pathogène.



Fig. 10: Symptôme d'hypersensibilité sur la variété résistante Marsellesa de *C. arabica*

L'ETI est souvent associée à une réaction de mort cellulaire programmée localisée au site d'infection et nommée HR (« Hypersensitive response » réaction d'hypersensibilité) qui bloque complètement la progression du pathogène.

1.2.2.5.4 Les réponses de défense non spécifiques

La résistance non spécifique appelée PTI ("PAMP-Triggered Immunity" ou Immunité médiée par les PAMPs) n'est pas basée sur une reconnaissance spécifique d'un gène de résistance avec un gène d'avirulence mais sur la reconnaissance de motifs moléculaires ubiquitaires et peu polymorphes de l'agent pathogène : les PAMPs ("Pathogen-Associated Molecular Patterns") et les DAMPs (« Damage-Associated Molecular Patterns ») (Zipfel, 2009). Les PAMPs sont des éliciteurs exogènes tels que la chitine présentes chez les champignons. (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010). Les DAMPs sont des éliciteurs endogènes tels que les produits de dégradation de paroi ou des fragments de cuticules libérés lors de l'infection par l'agent pathogène (Huffaker, Pearce and Ryan, 2006; Hückelhoven, 2007). Ces différents éliciteurs sont perçus par des protéines particulières de la plante, les PRRs (« Plant patternrecognition receptors ») (Zipfel, 2014). Ce sont des récepteurs transmembranaires de type RK (« Receptor Kinase » ou Récepteur Kinase) contenant un domaine kinase intracellulaire et un domaine récepteur extracellulaire de type LysM ou LRR (« Leucine Rich Repeat » ou domaine riche en leucine), ou de type RLP (« Receptor Like Proteins ») qui partagent la même structure que les RKs mais n'ont pas de domaine kinase cytoplasmique. Les RLPs fonctionnent le plus souvent en association avec des protéines RKs qui permettent la transduction du signal (Zipfel, 2014).

1.2.2.5.5 Bases moléculaires de la résistance

Basé sur ces deux types de réponses de défenses spécifiques et non spécifiques, le modèle en zig-zag permet d'expliquer l'interconnexion entre la résistance des plantes et les bases moléculaires du pouvoir pathogène. Au cours de sa pénétration, le pathogène libère des éliciteurs généraux type PAMPs ou DAMPs qui sont reconnus par les protéines PRRs de la plante déclenchant ainsi la « PTI » qui confère une résistance faible et non spécifique. Si le pathogène émet des effecteurs (protéines d'avirulence) qui bloquent cette voie de défense, la « PTI » est supprimée et la plante devient de nouveau sensible. C'est la sensibilité induite par les effecteurs ou « ETS ». Afin de reconnaître les protéines d'avirulence, la plante hôte doit être en mesure de synthétiser des protéines de type NB-LRR, protéines cytoplasmiques contenant un domaine NBS (« Nucléotide Binding Site ») et un domaine LRR (« Leucine-rich repeat ») permettant l'interaction protéine-protéine. Ces protéines NB-LRR sont codées par des gènes R et déclenchent l'ETI qui constitue une réaction de résistance beaucoup plus robuste que la PTI et entraîne une réaction de mort cellulaire programmée localisée au site d'infection nommée réaction d'hypersensibilité qui bloque complètement la progression du

pathogène. De nombreuses hormones végétales sont alors impliquées dans la signalisation de la réaction de défense, notamment l'acide salicylique (SA) et les cytokinines (CKs). Ces hormones sont par ailleurs essentielles à la mise en place de la SAR ('Systemic Acquired Resistance', résistance systémique acquise), qui va permettre la diffusion d'un signal de défense dans la plante entière et prévenir la présence de pathogène sur d'autres sites que celui de colonisation initiale (Durrant et Dong, 2004). Le pathogène évolue en acquérant de nouveaux effecteurs non reconnus (ou en modifiant ou supprimant la protéine d'avirulence) lui permettant ainsi de contourner la résistance, jusqu'à ce que de nouvelles protéines R apparaissent (Jones and Dangl, 2006)

1.2.2.5.6 Classification de l'hôte selon sa résistance ou sensibilité

Chez *Coffea*, la résistance spécifique de type gène pour gène est régie par 9 gènes de sensibilité exclusive de l'hôte, nommés SH1 à SH9 qui correspondent, gène pour gène, à 9 gènes d'avirulence de l'agent pathogène *avr1* à *avr 9* (Rodrigues Jr, Bettencourt et Rijo, 1975). La réaction est compatible quand le champignon possède tous les gènes de virulence correspondant aux gènes de sensibilité de l'hôte et conduit à une infection. Dans le cas contraire, la réaction est incompatible et conduit à une résistance de la part de la plante hôte. Parmi les 9 gènes de sensibilité, SH1, SH2, SH4 et SH5 ont été trouvés chez *C. arabica*, SH6-SH9 chez *C. canephora* et SH3 chez *C. liberica* (Alkimim *et al.*, 2017)

La résistance ou sensibilité d'une variété à une race de rouille est déterminée par inoculation artificielle. La validation est faite en infectant les feuilles de chaque génotype testé avec des races déjà isolées et caractérisées. Selon la réaction (résistance, tolérance ou sensibilité), la variété est classée dans un groupe physiologique nommé arbitrairement par des lettres de l'alphabet romain ou grec qui est caractérisé par la composition en gènes SH des variétés le composant. De même, les gènes de virulence déterminent les races du champignon. Actuellement, 40 groupes physiologiques de caféiers ont été identifiés et 53 races du pathogène sont connues. Les génotypes utilisés pour classer les groupes de résistance sont appelés différentiels. Les différentiels sont constitués de variétés de *C. arabica* et *C. canephora* et pour le plus grand nombre d'hybrides spontanés ou artificiels collectés dans le monde (Rodrigues Jr, Bettencourt and Rijo, 1975)

Quelques gènes de résistance non spécifiques ont été également identifiés chez *C. arabica*. Cacas *et al.* (2011) ont mis en évidence la présence du gène NDR1. Dans une étude de Ramiro *et al.* (2010), deux gènes issus de la famille des facteurs de transcription WRKY

sont exprimés dans les feuilles. Les facteurs de transcription WRKY ont un rôle important dans la régulation des stress abiotiques et biotiques chez les plantes (Pandey et Somssich, 2009; Jiang *et al.*, 2017). Ils régulent également la voie de biosynthèse de composés de défense comme les phénylpropanoïdes (Schlutenhofer et Yuan, 2015).

1.2.2.5.7 Le contournement des résistances

Il est admis aujourd'hui que la résistance non spécifique est davantage durable que la résistance spécifique reposant sur une relation gène pour gène (Lee *et al.*, 2017). A titre d'exemple, chez le blé, l'utilisation de plusieurs gènes conférant une résistance partielle *Lr34*, *Lr46*, *Lr67* et *Sr2* combinés à d'autres gènes mineurs a conduit à une gestion plus durable de la résistance à la rouille (Ellis *et al.*, 2014). Ce type de stratégie paraît intéressant pour la lutte contre *H.vastatrix*.

1.2.2.6 Vigueur et rouille chez Arabica

Par rapport aux plantes annuelles les plantes pérennes présentent une particularité essentielle : elles gardent une mémoire des conditions dans lesquelles année après année elles interagissent avec l'environnement durant leur croissance et leur développement (Ploetz, 2007). S'agissant de l'Arabica, il est très rare de constater des attaques de rouille importantes sur des plantes jeunes (entre 0 et 18 mois l'âge de la première récolte). Lorsque des attaques sont observées c'est toujours sur des plantes qui ont manqué de soin en phase de pépinière. Les attaques de rouille les plus fortes se localisent avant tout sur les plantes arrivées en fin de cycle de production. En culture, le caféier est taillé après 3 à 5 récoltes. Cette taille s'apparente à un recépage plus ou moins sévère. Le nombre de récoltes dépend i) de la température moyenne (plus l'altitude est élevée, moins la plante est précoce et plus le cycle est long), ii) des soins apportés à la plante, iii) de la fertilité du sol, iv) des quantités cumulées produites. On dit communément que la taille doit avoir lieu lorsque le caféier est épuisé (en pratique cette taille devrait avoir lieu juste avant 'l'épuisement'). Une plante est considérée épuisée lorsque son potentiel de production est durablement compromis. Or, lorsque cet épuisement survient il est associé aux attaques de rouille les plus sévères. Des expériences au champ menées par Bouharmont (1995) montrent que le développement de la rouille est fonction du niveau de production, l'incidence de la rouille étant fonction du niveau de production des plantes. Il montre sur la variété Java que les arbres dont tous les fruits ont été coupés ont seulement 3 % de feuilles infestées contre 60% pour les arbres produisant 2 tonnes par hectare. Plus récemment, Bertrand (communication personnelle) a confirmé ce résultat.

En enlevant tous les fruits (environ deux mois après leur formation) sur des arbres sensibles au milieu d'un verger d'une variété sensible, il constate que l'épidémie de rouille atteint sévèrement tous les arbres mais qu'elle épargne ceux qui ne fructifient pas, en ne leur causant que des symptômes extrêmement réduits. Un autre fait à prendre en considération et qui va dans le même sens est celui du pic d'incidence lors d'une épidémie. L'épidémie débute avec la saison des pluies et son pic s'établit toujours juste avant la récolte des fruits, ce qui correspond au moment où la plante a dépensé le plus d'énergie pour le remplissage des fruits. Cette relation entre le niveau de production et l'incidence de la maladie a été retrouvé par Avelino *et al.* (2006) lors d'une enquête sur plusieurs dizaines de parcelles situées dans des environnements contrastés. Il montre que l'incidence de la maladie varie en fonction de plusieurs facteurs : niveau d'azote, pH du sol, niveau de production des arbres. Il retrouve ainsi à l'échelle d'une région ce que Bouharmont a montré à l'échelle d'une parcelle ou ce que Bertrand a constaté à l'échelle de la plante.

Plus récemment, en utilisant des hybrides F1 sensibles, sélectionnés pour leur vigueur et leur homéostasie, les agronomes (Lambot, Bertrand, communication personnelle) ont constaté qu'ils étaient moins sensibles que les variétés lignées sensibles. En se basant sur ces données empiriques, il semble qu'il existe une relation générale et robuste entre la santé de la plante et l'incidence de la rouille orangée. C'est ce faisceau de présomptions qui a suscité les travaux qui sont présentés dans ce travail de thèse.

1.3 Approches et objectifs du projet de thèse

Ce travail de thèse s'inscrit dans ces thématiques et vise à comprendre comment les facteurs génotypiques et environnementaux en impactant la santé du caféier influent sur l'incidence de la rouille puis à comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Dans le cas du caféier, la combinaison d'un stress hydrique, d'une forte intensité lumineuse, d'un stress thermique et d'un manque d'azote dans le sol constitue une situation classique lors de la saison sèche en Amérique Centrale, Andine, ou au Mexique. L'arrivée de la saison des pluies va mettre fin au stress hydrique, réduire le stress lumineux et thermique, et permettre aux plantes de récupérer alors même que d'autres stress vont survenir, à l'image des attaques fongiques (rouille) ou d'insectes (scolytes). Ainsi, dans notre étude, nous avons choisi d'étudier une variété lignée et deux hybrides dans deux conditions d'intensité lumineuse et dans deux conditions de fertilisation azotée à un régime thermique normal ainsi qu'à un régime thermique correspondant aux prévisions climatiques dans la zone de culture d'Arabica. Nous avons choisi les deux niveaux d'intensité lumineuse de manière à tester l'impact de l'agroforesterie versus plein soleil. Les deux niveaux d'azote permettent de reproduire les stress qui ont lieu lorsque le cours du café s'effondre et que les caféiculteurs sont dans l'incapacité de fertiliser leur sol.

1. Influence des conditions environnementales et du fond génétique de *C. arabica* sur la pathogénèse d'*H. vastatrix*.

Les objectifs de cette première étude se focalisent ainsi sur trois points principaux :

Dans quelles mesures les conditions environnementales (température, fertilisation azotée, intensité lumineuse) en impactant l'état physiologique de *C. arabica* modifient elles l'incidence de la rouille orangée ?

Les hybrides F1 subissent-ils des attaques de rouille moins sévères que la variété lignée Caturra et si oui, dans quelles conditions de culture ?

Est-il possible d'identifier des indicateurs de l'état physiologique avant infestation capables de prédire l'incidence de la rouille orangée ?

Ces points seront abordés dans la partie 2 de la thèse.

2. Etude de la meilleure performance agronomique d'un clone d'hybride F1 de *C. arabica* via une approche de transcriptomique.

La rouille a une incidence moins importante sur les hybrides étudiés que sur la variété lignée Caturra. Nous avons montré dans la première partie de ce travail de thèse que l'état physiologique de l'hybride est différent de celui de la lignée. La publication de Ni et collaborateurs (2009) démontre que l'horloge interne d'un allotétraploïde ou d'un hybride chez *Arabidopsis* est dérégulée par rapport à celle des parents diploïdes avec pour conséquence un métabolisme énergétique accru. Ainsi en faisant appel à des techniques de chimie analytique, de mesure de fluorescence, de PCR quantitative et de transcriptomique (RNAseq), l'objectif de cette partie est de répondre à la question suivante :

La théorie développée par Ni et collaborateurs (2009) consistant à dire que la vigueur hybride proviendrait en partie d'une dérégulation de l'horloge circadienne se vérifie-t-elle chez le caféier ?

Ce point sera abordé dans la partie 3.

3. Etude du transcriptome de variétés hybrides d'*Arabica* au cours de l'infection par la rouille orangée.

Cette étude se focalisera sur les questions suivantes :

Quels sont les gènes impliqués dans la moindre infestation observée sur les hybrides et dans la plus forte infestation observée chez la lignée ?

Ces gènes candidats sont-ils liés au métabolisme primaire ou impliqués dans des voies de biosynthèse de composés de défense ou encore dans les voies de signalisation ?

Ces points seront abordés dans la partie 4 via un algorithme permettant d'identifier des gènes candidats.

**Partie 2. Influence des conditions
environnementales et du fond génétique de *Coffea
arabica* sur la pathogénèse d'*Hemileia vastatrix*.**

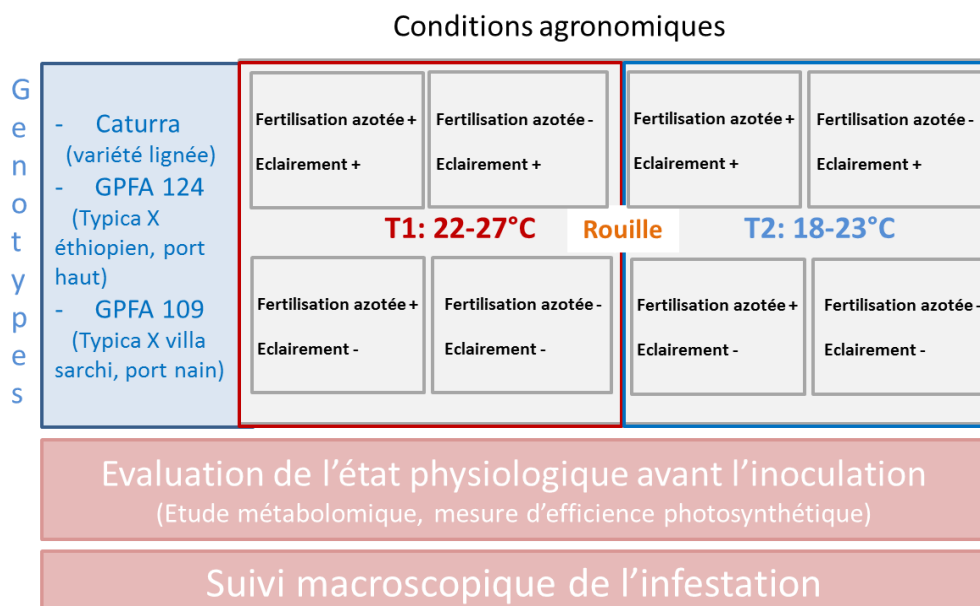
Article publié dans Frontiers in Plant Science le 28 Novembre 2017

2.1 Contexte

Depuis 2008 une vague d'épidémie de rouille orangée sévit en Mésio-Amerique de la Colombie au Mexique incluant le Pérou, l'Equateur et quelques pays des caraïbes (Avelino *et al.*, 2015). Le changement récent des conditions météorologique a eu un fort impact sur ces épidémies. Les stratégies d'introggression de gènes de résistance *SH* s'avèrent peu durables ce que confirme la récente annonce des autorités du Honduras disant que la variété Lempira (Catimor) n'était plus considérée comme résistante après le contournement de ses gènes de résistances par *Hemileia vastatrix*. Avec le changement climatique, une augmentation de la fréquence et de l'intensité des épidémies de rouille est à prévoir. Trouver des stratégies permettant de limiter l'incidence de la rouille devient alors prioritaire. Il a été montré dans une étude préliminaire sur caféier qu'une forte productivité est associée à une forte incidence de rouille suggérant que le ratio feuille : fruit et plus généralement l'état physiologique de la plante pourrait être un facteur déterminant de la réaction du caféier aux infections.

2.2 Stratégie

Dans le cadre de la caféiculture en Amérique Centrale et Andine ou au Mexique, les plantes sont cultivées soit en système agroforestier, soit en plein soleil. En fonction du cours mondial du café et donc des prix de vente, les producteurs ont ou non les moyens de fertiliser et de réaliser des traitements phytosanitaires. Classiquement, lors de la saison sèche, les caféiers peuvent subir la combinaison d'un stress hydrique, d'une forte intensité lumineuse (culture sans ombrage), d'un stress thermique et d'un manque d'azote dans le sol. L'arrivée de la saison des pluies va mettre fin au stress hydrique, réduire les stress lumineux et thermique, et permettre aux plantes de récupérer alors même que d'autres stress vont survenir, à l'image des attaques fongiques (rouille, anthracnose) ou d'insectes (scolytes). Partant de ce constat, un plan d'expérimentation a été construit afin d'étudier le comportement de deux types d'Arabica, lignée vs Hybrides, cultivés avec différents niveaux de fertilisation et dans des contextes lumineux très différents, sous deux régimes thermiques (un plutôt idéal et l'autre correspondant à des températures élevées équivalentes aux prévisions climatiques).



Cette première étude porte sur deux hybrides sélectionnés par Nestlé pour leurs qualités agronomiques ainsi que sur la variété lignée Caturra (variété élite, référence pour la qualité à la tasse) utilisée ici comme témoin expérimental et référence en terme de caféiculture. Les plantes sont soumises à deux régimes thermiques ; un régime thermique normal (18-23°C), et un régime thermique élevé (22-27°C) qui constituent deux expérimentations distinctes. Pour

chaque expérimentation, la moitié des plantes reçoit une faible intensité lumineuse (300 PAR en moyenne) et l'autre moitié une forte intensité lumineuse (1000 PAR en moyenne) afin de mimer les conditions de culture sous couvert végétal (Agroforesterie) ou en plein champ (productiviste). Chacun de ces deux lots de plantes est divisé en deux, un lot reçoit une faible fertilisation en azote, alors que le second est fertilisé avec une forte dose d'engrais azoté, toujours dans l'optique de mimer la réalité agronomique. Nous avons évalué l'état physiologique des caféiers avant infestation par une étude métabolique ainsi qu'une mesure indirecte de l'efficacité photosynthétique par mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* en utilisant un Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd, England).

2.3 Conclusions

Nous avons montré en conditions contrôlées que 3 génotypes (une variété lignée et deux hybrides) de *Coffea arabica*, tous sensibles à la rouille orangée, subissent des attaques de rouille d'intensités significativement différentes suivant les conditions agronomiques (fertilisation azotée, intensité lumineuse, température). Nos résultats suggèrent que l'utilisation d'hybrides F1 en agroforesterie avec une fertilisation azotée suffisante permettrait de limiter l'incidence de la rouille orangée. Des mesures de la fluorescence de la chlorophylle *a* avant l'infestation ont permis de réaliser une mesure indirecte de l'état physiologique du caféier. Elle constitue la plus pertinente des variables au regard de toutes les variables métaboliques analysées. Certains indicateurs du fonctionnement du photosystème II et de la chaîne de transport d'électrons se sont avérés être de bon prédicteurs de l'incidence de la rouille. Du fait de l'importance des interactions génotype - environnement, les nombreux métabolites mesurés (issus du métabolisme primaire ou secondaire) n'ont pas permis de définir des indicateurs de l'état physiologique capables de prédire l'intensité de l'infestation en s'affranchissant du génotype. Cependant il semblerait que le ratio C/NH4 puisse être un bon prédicteur de l'intensité de l'attaque de rouille. Il serait intéressant d'analyser plus précisément ce paramètre.

2.4 Article

Influence of Environmental Conditions and Genetic Background of Arabica Coffee (*C. arabica* L) on Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) Pathogenesis

Running title: environment influence on CLR pathogenesis

Authors: Lucile Toniutti^{1,3,*}, Jean-Christophe Breitler¹, Hervé Etienne¹, Claudine Campa², Sylvie Doulebeau², Laurent Urban⁴, Charles Lambot³, Juan-Carlos Herrera Pinilla³ and Benoît Bertrand¹

¹CIRAD, UMR IPME, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier, France

²IRD, UMR IPME, 911 Avenue Agropolis, BP 64501, 34394 Montpellier, France

³ Nestlé R&D Tours, 101 AV. G. Eiffel, Notre Dame d'Oe', BP 49716, 37097 Tours Cedex 2, France

⁴ UMR QualiSud, Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Avignon, France

*Corresponding author: E-mail, lucile@toniutti.net

2.4.1 Abstract

Global warming is a major threat to agriculture worldwide. Between 2008 and 2013, some coffee producing countries in South and Central America suffered from severe epidemics of coffee leaf rust (CLR), resulting in high economic losses with social implications for coffee growers. The climatic events not only favoured the development of the pathogen but also affected the physiological status of the coffee plant. The main objectives of the study were to evaluate how the physiological status of the coffee plant modified by different environmental conditions impact the pathogenesis of CLR and to identify indicators of the physiological status able to predict rust incidence. Three rust susceptible genotypes (one inbred line and two hybrids) were grown in controlled conditions with a combination of thermal regime (TR), nitrogen and light intensity close to the field situation before being inoculated with the rust fungus *Hemileia vastatrix*. It has been demonstrated that a TR of 27 -

22 °C resulted in 2 000 times higher sporulation than with a TR of 23-18 °C. It has been also shown that high light intensity combined with low nitrogen fertilisation modified the CLR pathogenesis by increasing host penetration/colonisation resulting in huge sporulation. CLR sporulation was significantly lower in the F1 hybrids than in the inbred line. The hybrid vigour may have reduced disease incidence. Among the many parameters studied, parameters related to photosystem II and photosynthetic electron transport chain components appeared as indicators of the physiological status of the coffee plant able to predict rust sporulation intensity. Taken together, these results show that CLR sporulation not only depends on the TR but also on the physiological status of the coffee plant, which itself depends on agronomic conditions. Our work suggests that vigorous varieties combined with a shaded system and appropriate nitrogen fertilisation should be part of an agro-ecological approach to disease control.

Keywords: *Coffea arabica*, coffee leaf rust, biotic-abiotic interaction, chlorophyll *a* fluorescence, hybrid vigour

2.4.2 Introduction

Coffee is a product of mass consumption; with an estimated 2.4 billion cups consumed per day worldwide and with an average of 2.4% annual growth over the last 10 years, coffee is one of the world's favourite beverages (International Coffee Organization 2016). The annual turnover is approximately 30 billion Euros. Although coffee is not a food crop, it represents a major foreign exchange for earner in many developing countries (Ponte, 2002). The genus *Coffea* comprises approximately 70 species but only two are cultivated at world scale: *C. arabica* and *C. canephora* (Wintgens 2012). In 2015, *C. arabica* accounted for 58% of coffee production worldwide (International Coffee Organization 2016). Whereas *C. arabica* originated in Ethiopia, today, the main cultivation areas are in South and Central America, which together account for more than 80% of world coffee production (Bertrand et al. 2012). The optimum mean annual temperature for Arabica coffee ranges from 18 °C to 21 °C (DaMatta and Cochicho Ramalho, 2006). Arabica coffee originates in humid forest, *i.e.* growing under shade conditions. However, the Arabica coffee tree has enough plasticity to be cultivated in both full sun and shade, although large quantities of external inputs are required under full sun (Matos *et al.*, 2009).

Coffee leaf rust (CLR), the main fungal disease affecting coffee production worldwide, is caused by the biotrophic basidiomycete *Hemileia vastatrix* Berk. & Broome (Basidiomycota, Pucciniales) and occurs in almost all producing countries (Silva *et al.*, 2006). It is considered to be the most devastating disease for this culture. The parasite affects living leaves and causes orange lesions on the underside of the leaves. This reduces the photosynthetic area and in severe attacks, defoliation can occur leading to die-back of branches with heavy losses for farmers. The optimum temperature for germination is between 22 °C and 24 °C (De Jong *et al.*, 1987; Rozo *et al.*, 2012). Within the *Coffea* genus, *C. arabica* is subject to the most severe attacks with up to 30% losses if the disease is not controlled (Rozo *et al.*, 2012).

From 2008 to 2013, more intense coffee rust epidemics than those previously observed occurred in Mesoamerica, from Colombia to Mexico, including Peru, Ecuador and some Caribbean countries (Avelino *et al.*, 2015). These outbreaks were the worst since the disease first appeared in Central America in 1976. In Colombia, the incidence of the disease in the field increased from less than 5% before 2008 to more than 40% (Rozo *et al.*, 2012) and was responsible for average reductions of 31% and 16% during the epidemic years compared with 2007 in Colombia (Cristancho *et al.*, 2012) and Central America respectively. Because the majority of coffee is mainly produced by smallholders managing less than 10 ha of coffee (Jha *et al.*, 2012), rust epidemics in Central America have had indirect impacts on food security. Several hypotheses have been proposed to explain the outbreak, including the emergence of a new virulence race of the pathogen and changes in plantation management. Indeed, fertiliser use declined due to the dramatic rise in prices during the 2008 global financial crisis, thus reducing the vigour of the coffee plants. Meteorological anomalies caused by the ongoing climate change are considered to be one of the main factors contributing to the emergence of the rust epidemic in 2012-2013, and to affect both the pathogen and the physiological status of the coffee tree (Cristancho *et al.*, 2012; Avelino *et al.*, 2015). However, in a study focussed only on pathogen response, Bebber *et al.* (2016) found that climate change had no effect on germination and appressorium formation and consequently did not significantly favour leaf infection.

For many years, breeding for CLR resistance was based on highly specific complete resistance derived from a major introgressed gene from the Hybrid of Timor (Herrera *et al.*, 2008). However in some countries, host resistance to CLR acquired from introgressive breeding with Hybrid of Timor clones as donor parent has turned out not to be durable (Van Der Vossen *et al.*, 2015). Developing strategies to improve the durability of rust resistance in

Arabica cultivars based on genetic mechanisms combining both partial and complete resistance genes along with appropriate cultural practices, may be the best way to control this disease.

Although plant resistance is genetically controlled, the environment and particularly nutrition can affect plant tolerance or resistance to pathogens by affecting plant physiology, the pathogen or both (Dordas, 2008). Pioneer studies on rust showed that the vegetative vigour of cereals reduced disease incidence (Raines M.A., 1922). A preliminary study on coffee demonstrated that high productivity is positively correlated with the incidence of rust. In the Java variety, coffee trees from which 100% of the fruits had been removed subsequently had only 3% of infected leaves versus 60% in coffee trees with a yield of two tons per hectare (Bouharmont 1995). A field survey strengthened these results by showing that a heavy fruit load enhanced rust infection (Avelino *et al.*, 2006). It is generally known that good agronomic practices help control epidemics. These studies suggest that the leaf to fruit ratio could be a major determining factor of the reaction of the plant to the infection. Indeed, in coffee plants, fruits are typical sink-organs that influence the source sink balance as well as the physiological status of the tree (Vaast *et al.*, 2006).

In some species, hybrid vigour has been shown to enhance their immune response (LeBoldus *et al.*, 2013). Groszmann *et al.* (2015) showed that in *Arabidopsis*, hybrid vigour led to a different growth-defence balance with a higher growth rate and reduced basal defence gene activity, which, however, did not compromise their ability to set up a defence response comparable to that of the parents. Preliminary observations in coffee (by the authors of the present study) suggest that susceptible F1 hybrids are less severely attacked by coffee leaf rust than pure lines. The use of F1 coffee hybrids could thus be a viable short-term alternative to seeking durable resistance against coffee leaf rust.

The main objectives of the present study were thus (i) to evaluate how the physiological status of the coffee plant modified by different environmental conditions influences the pathogenesis of leaf rust disease and (ii) to identify indicators of the physiological status able to predict rust incidence.

We compared three susceptible genotypes (the inbred Caturra line and two F1 hybrids) using a combination of multiple stresses close to real field conditions (nitrogen fertilisation, shade) before inoculating the coffee plant with the rust fungus *H.vastatrix*. Before investigating the impact of nitrogen and shade on rust incidence in three genotypes, the inbred

line caturra has been studied under two thermal regimes to identify the most suitable thermal regime to analyse the impact of the physiological status of the coffee plant (*Coffea arabica*) on the incidence of rust.

2.4.3 Materials and methods

2.4.3.1 Plant material and cultivation in a phytotron

Three rust susceptible genotypes were studied: one inbred line *Coffea arabica* var Caturra and two Arabica hybrids: GPFA 109 and GPFA 124. The Caturra seeds came from the La Cumplida research centre (Matagalpa, Nicaragua). The two intraspecific Arabica hybrids GPFA109 and GPFA124 were vegetatively propagated by somatic embryogenesis at the Nestlé R&D laboratory (Tours, France). Both hybrids were selected for high cup quality, high productivity and excellent growth behaviour. They are not expected to carry any specific genetic resistance to prevalent rust races. The plants were cultivated in a phytotron (65-75% humidity, 12 h day/12 h night) at CIRAD (Montpellier, France) in 3 L pots containing a 50:50 GO M2 (Jiffygroup) and N°9 (Neuhaus) potting soil mixture. Water was supplied every day and 39 mg of MS/2 medium (Murashige and Skoog, 1962) and 3 mg of KCl were applied to each coffee plant once a week for 11 weeks.

Eight thermal regime (2) x nitrogen fertilisation (2) x light intensity (2) treatments were compared. For each condition, four plants were studied for rust infection and fluorescence measurements, and three plants for chemical analysis. The two thermal regimes (TR) *i.e.* day/night temperatures tested were: TR (27-22 °C) and TR (23-18 °C). Each coffee plant in the low nitrogen fertilisation group was fertilised with a solution containing 35 mg of NH_4NO_3 once a week for 11 weeks *i.e.* a total of 134 mg of nitrogen, whereas each coffee plant in the high nitrogen fertilisation group was fertilised with a solution containing 69 mg of NH_4NO_3 per week, *i.e.* a total of 266 mg of nitrogen. The two light intensity levels tested were a photosynthetically active radiation (PAR) of 300 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ *i.e.* low light intensity, and a PAR of 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ *i.e.* high light intensity, mimicking the light intensity perceived in an agroforestry system, and in a full sunsystem respectively.

2.4.3.2 Rust inoculation

The inoculum was composed of a mixture of urediniospore of *H.vastatrix* collected from Caturra, wild Ethiopian and Castillo coffee plants at the Cenicafe “Naranjal” experimental station located in the central coffee cultivation region in Colombia. This population of urediniospore mimicked the field CLR races currently found in the field.

The inoculation suspension was prepared by adding 0.5 mg of urediniospore per ml of sterile distilled water. The suspension was shaken for 30s under sonication. To test the viability of the spores, 20 drops (5 µl each) of the inoculation suspension were cultured in 1% agar-water medium in Petri dishes. The dishes were kept in the dark at 20 °C for 12 h. After the spores were stained with lactophenol, the germination rate of at least 500 spores was evaluated. Observations were made with a 40x binocular magnifier. An inoculum was considered suitable for rust infection when the germination rate was over 60%.

The leaves of 6-month-old plantlets (around 35 cm in height) were inoculated by spraying a suspension of urediniospore over the lower surface of each leaf of each tree. After inoculation, the plants were kept for 48 h in the dark at 23 °C and 100% relative humidity.

2.4.3.3 Macroscopic monitoring of the infection

The infection was monitored macroscopically in quadruplicate using a completely random experimental design. To characterise the infection, two indicators of rust incidence were measured on each coffee plant:

The percentage of infected leaves during the time course of the infection: the percentage of leaves with at least one sporulating lesion was determined 21, 24, 37, 43 days post-inoculation (dpi) for TR (27-22 °C) and 24, 30, 35, 43 days post-inoculation (dpi) for TR (23-18 °C).

Quantity of rust per infected leaf area produced by *H.vastatrix*: At 43 dpi, the rust was harvested from each leaf of each coffee plant and weighted per tree. Leaf area was measured on leaves with at least one sporulating lesion. The quantity of rust per infected leaf area represents the ratio of the weight of the rust to the cumulated infected leaf area per tree.

2.4.3.4 Chemical analyses

Samples for chemical analysis were collected one day before inoculation at Zeitgeber time =10 h (ZT10), on plants cultivated in the same conditions as the inoculated plants. Leaves were immediately frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until freeze-drying. Analyses were performed in triplicate on three independent plants and three different extractions, using a completely random experimental design.

2.4.3.5 Determination of mineral elements

Mineral elements were determined by the CIRAD US-Analyses laboratory. Nitrogen was determined using the Dumas method. Roughly 150 mg of dry powder was weighed precisely in tin foil and analysed using Leco's Nitrogen Determinator (model FP-528, Leco Corp., St. Joseph, MI). The nitrogen content (in milligrams per gram) was determined using calibration curves set up using commercial standards of EDTA and orchard leaves. The other elements (P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, and B) were determined by inductively coupled argon plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES) after dry mineralisation. Samples were analysed by ICP-OES using an Agilent 720-ES equipped with a CCD detector. NO_3^- and NH_4^+ were extracted from 500 mg of dry powder and quantified with a continuous-flow colorimeter. All elements were determined in triplicate and are expressed as a percentage of dry weight (% DW) or parts per million (ppm).

2.4.3.6 Sugar metabolism

Sugars were extracted from 20 mg samples of freeze-dried powder and measured by high performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (Dionex Chromatography Co., Sunnyvale, USA) as described in (Dussert *et al.*, 2006).

The starch content of 30 mg of freeze-dried powder was determined using the total starch kit GOPOD (D-glucose, K-Gluc, Megazyme International, Ireland). After elimination of soluble sugars and of the soluble products of starch degradation, the residue was successively hydrolysed into glucose units with α -amylase and amyloglucosidase. The resulting D-glucose was then degraded with glucose oxidase and the resulting hydrogen peroxide quantified by spectrophotometry at 510 nm after a last enzymatic reaction. Results are expressed as % DW.

2.4.3.7 Phenolic extraction and quantification

The lyophilised plant material was ground in a ball mill (TissueLyser II, Qiagen) and extracted at 4 °C for 3 h under stirring (225 rpm, Rotamax 120, Heidolph) using 25 mg of plant material in 6 mL of MeOH/H₂O (80:20, v/v). After centrifugation for 8 min at 3500 rpm, the methanol extract was collected and filtered (Millipore, 0.25 µm porosity) before analysis. Each sample was characterised by its mean concentration of purine alkaloid (caffeine), hydroxycinnamic acid esters (caffeoylquinic acids, dicaffeoylquinic acids, one feruloylquinic acid isomer), xanthone (mangiferin) and flavonoids ((+)-catechin, (-)-epicatechin), expressed as % DW. Quantification was carried out on 10 µL of extract using a HPLC system (Shimadzu LC 20, Japan) equipped with a photodiode array detector consisting of an eclipse XDB C18 (3.5 µm) column (100 mm × 4.6 mm, Agilent). The elution system (0.6 mL min⁻¹) was comprised of two filtered (0.2 µm pore size filter), sonicated and degassed solvents, solvent A (water/acetic acid, 98:2, v/v) and solvent B (H₂O/MeOH/acetic acid, 5:90:5 v/v/v). The linear gradient was 0 min, 15% solvent B; 0–4 min, 25%; 4–8 min, 32%; 8–10 min, 35%; 10–14 min, 58%; 14–16 min, 62%; 16–18 min, 64%; 18–21 min 80%; 21–24 min 15% ; 24–26 min, isocratic.

The calibration curve was plotted using three replicate points of standard solutions of caffeine, mangiferin, 5-CQA, purchased from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France), glucosylated kaempferols and quercetin, rutin, (+)-catechin, (-)-epicatechin and epigallocatechin from Extrasynthese (Lyon, France) and 3,5-o -dicaffeoylquinic acid (3,5-diCQA) from Biopurify Phytochemicals (Chengdu, China) at 25, 50, 75 and 100 µg mL⁻¹. Identification was performed by comparing spectra and retention times at 280, 320 and 360 nm. Quantification of caffeoylquinic acids (3-, 4- and 5-CQA), feruloylquinic acids (one FQA isomer) and dicaffeoylquinic acids (3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA) was performed at 320 nm, caffeine and catechin derivatives at 280 nm, and mangiferin, kaempferol and quercetin derivatives at 360 nm, by comparison with their respective standards.

2.4.3.8 Phenotyping

One day before inoculation, plant height, and the fresh weight and dry weight of the roots, shoots and the entire plant, and specific leaf weight and stomatal density were measured for each condition on 4 plants per genotype.

2.4.3.9 Chlorophyll *a* fluorescence measurements

Chlorophyll *a* fluorescence measurements were conducted between ZT9 to ZT11 with a Handy PEA chlorophyll fluorimeter (Handy-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) on mature leaves. Measurements were performed in quadruplicate. Four fluorescence measurements per plant were performed. Leaves were dark-adapted for 20 min prior to measurement. When leaves kept in the dark are illuminated, chlorophyll *a* fluorescence intensity shows characteristic changes called fluorescence transient (Stirbet, 2011). Chlorophyll *a* fluorescence transients were induced by 1 s illumination with an array of six light-emitting diodes providing a maximum light intensity of 3000 PAR. The fast fluorescence kinetics (from F_0 to F_M , where F_0 and F_M are, respectively, the minimum and maximum measured chlorophyll fluorescence of PSII in the dark-adapted state) was recorded from 10 μ s to 1 s. Dark-adaptation allowed the PSII electron acceptor pool to be gradually re-oxidized to a point where all PSII reaction centres are capable of photochemistry. Fluorescent transients were analysed using the JIP test developed by Strasser and Strasser (1995). The JIP test evaluates the balance between total energy inflows and outflows and provides the probable distribution of light energy absorption (ABS) between the events: trapping (TR), electron transport (ET) and dissipation (DI) (Kalaji *et al.*, 2016). Some parameters were analysed in more detail: (1) The average absorbed photon flux per PSII reaction centre (J^{ABS}/RC), which expresses the apparent antenna size of an active PSII; (2) The maximum quantum yield of photosystem II ($F_V/F_M=TR/ABS$), which expresses the trapping flux/absorption flux. This describes the performance of the light reaction; (3) The pool size of electron carriers per RC of PSII ($Sm=Area/(F_M-F_0)$), which is proportional to the number of electrons passing through the electron transport chain; (4) The quantum yield of the electron transport flux up to the PSI electron acceptors (J_0^{RE1}/J^{abs}), which expresses the rate of electron transport from QB to PSI acceptors (Stirbet, 2011).

2.4.3.10 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using R 3.2.4 software.

For each treatment, a Student's test was performed to test the effect of the thermal regime on the percentage of infected leaves and on the quantity of rust per infected leaf area at 43 dpi (stats package). Tests for normality and equality of variance (Shapiro test and Levene test, car package) were performed. Alternatively, the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was performed (stats package).

One-way ANOVA of the two indicators of rust incidence and on all metabolic and phenotyping variables was performed to test the effect of the different treatments and genotypes. Prior to each ANOVA, tests for normality and equality of variance were performed (Shapiro test and Levene test, car package) and significant effects were analysed by multiple comparisons of means (Tukey honest significant differences test, stats package). Data that did not conform to conditions of normality and homoscedasticity were log transformed. When the conditions of normality were not fulfilled despite the logarithm transformation, a non-parametric Kruskal-Wallis test was performed (pgirmess package).

Logarithmic regression between parameters derived from Chlorophyll *a* fluorescence induction curve and the quantity of rust per infected leaf area at 43 dpi were fitted using nonlinear least square for estimating parameters (stats package). The equation was $aa \cdot \log_{10}(X) + bb$. Starting values were initiated to $a=0.5$ and $b=1$. Only points corresponding to high light intensity were fitted.

2.4.4 Results and discussion



Fig. 11: Arabica coffee plants infected by *H.vastatrix*. Symptoms in the controlled conditions of this study [A] were quite similar to those observed in field conditions [B].

The level of rust infection of three genotypes has been compared (one inbred line and two F1 hybrids) cultivated under different combinations of agronomic conditions close to those found in real field conditions (nitrogen fertilisation, light intensity) (**Fig. 11**). Two thermal regimes were tested, the first corresponding to the most suitable thermal regime for the production of Arabica coffee and the second corresponding to the probable future thermal regime in Arabica cultivation area under continuing global warming (Bunn *et al.*, 2015).

2.4.4.1 TR (27-22 °C) was the most favourable thermal regime for rust

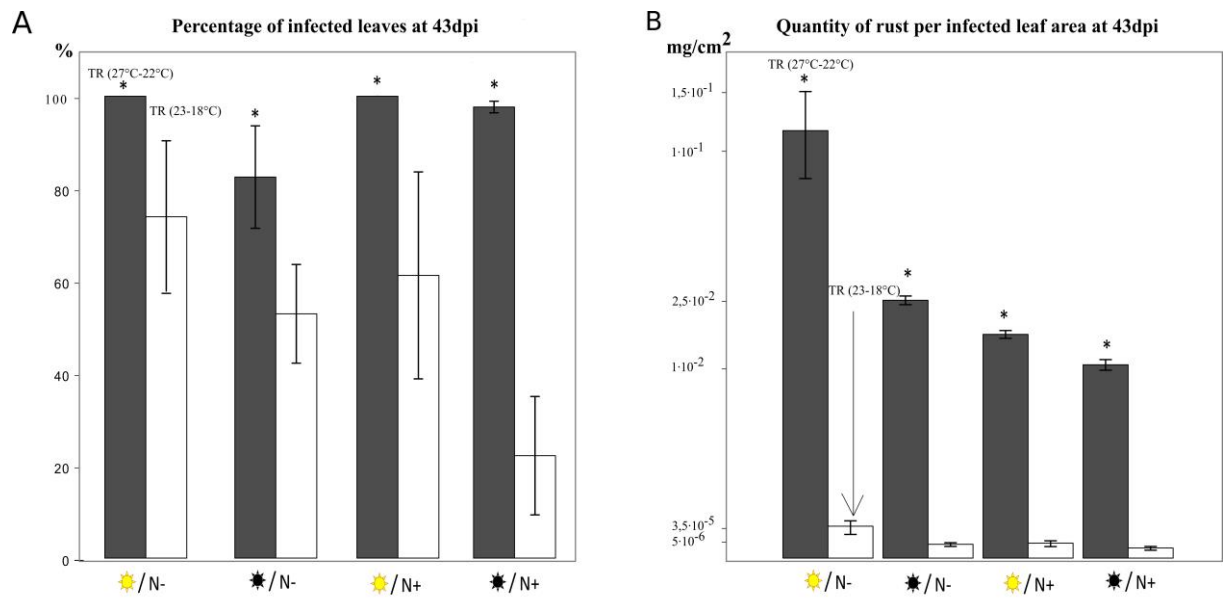


Fig. 12: Comparison of two thermal regimes in the inbred line Caturra with different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation 43 days post *H.vastatrix* inoculation. A. Percentage of infected leaves. B. Quantity of rust per infected leaf area. The quantity of rust per infected leaf area is plotted on a cube root scale in order to present the two thermal regimes on the same plot despite the marked differences between the values. Four treatments were studied ☀/N- ★/N- ☀/N+ ★/N+ corresponding to respectively high light intensity (1000 PAR) / low nitrogen fertilisation, low light intensity (300 PAR)/ low nitrogen fertilisation, high light intensity(1000 PAR) / high nitrogen fertilisation, low light intensity(300 PAR)/ high nitrogen fertilisation. The thermal regime 27 °C-22 °C is in black and the 23 °C-18 °C regime is in white. The data are means +/- SD (n=4). Within each treatment, means from thermal regimes followed by an asterisk are significantly different according to Student's test ($P < 0.05$). The incidence of rust was lower under the colder thermal regime. The 27-22 °C regime appears to be the most suitable to study the influence of the different light and nitrogen conditions on rust incidence.

Caturra and closely related varieties (Mundo novo, Catuai, Typica) currently account for 80% of coffee orchards worldwide. The two thermal regimes were consequently compared using Caturra for the percentage of infected leaves and for the quantity of rust per infected leaf area at 43 dpi (**Fig. 12**).

The 27-22 °C thermal regime increased the infection of leaves by the rust (**Fig. 12A**). Under TR (27-22 °C), regardless of the light intensity and nitrogen fertilisation: at least 80% of Caturra leaves were infected at 43 dpi. By contrast, under TR (23-18 °C) the mean percentage of infected leaves never reached 80%. The thermal regime affected the quantity of rust produced even more intensely (**Fig. 12B**). The quantity of rust per infected leaf area was 10 000 times higher under TR (27-22 °C) than under TR (23-18 °C) and a cube root scale was

needed to plot the two thermal regimes on the same graph. Consequently, the best indicator to study the influence of the different treatments on rust incidence appears to be the quantity of rust per infected leaf area not only because it discriminated the different treatments better but also because it will have the most impact for the farmers (**Fig. 12**). In Caturra, the latent period (defined as the period from inoculation until the formation of sporulating lesions) was longer under TR (23-18 °C) than under TR (27-22 °C) (**Fig. 12**). Under TR (23-18 °C), the percentage of infected leaves reached 50% on average 11 days later than under TR (27-22 °C) resulting in slower infection.

The role of weather particularly of temperature in the likelihood of disease outbreak is well known to farmers. Both pioneer and recent studies showed that the germination of *H. vastatrix* urediniospore and subsequent penetration into the leaf via stomata is highly dependent on surface wetness and temperature (Bebber, Castillo and Gurr, no date; Nutman, Roberts and Clarke, 1963). The optimum temperature for germination reported in the historical and recent studies was not the same, suggesting that *H. vastatrix* adapted to warmer temperatures. De Jong et al. (1987) found the optimum temperature for germination to be 22 °C, whereas Rozo et al. (2012) reported 24 °C to be the optimum temperature. In our experiment, all the coffee plants were kept at a constant temperature of 23 °C for 48 hours following inoculation before being subjected to the two thermal regimes. The effect of the temperature observed in our study showed that the temperature not only affects germination but also affected later stages of fungal development (*i.e.* colonisation of host tissue). Kushalappa et al. (1989) reported that an increase in temperature was associated with a decrease in the length of the latent period of *H. vastatrix*, resulting in more rapid infection. Temperature has also been shown to have a notable effect on the rapidity of infection by other fungal pathogens. Magarey et al. (2005) adapted a temperature response function to create a model for predicting infection periods by fungal foliar pathogens and validated it with a large experimental data set. In peppermint rust, Edwards et al. (1998) reported that the latent period of infection was five times shorter at 22 °C than at 5 °C. Even if the effect of the environment on the sporulation process of *H. vastatrix* is well known (Kushalappa et al. 1989), the link between the quantity of spores produced and the temperature has not been yet investigated. In peppermint, a significant effect of temperature on *Puccinia menthae* sporulation has been reported. Daily spore production increased more than three times with an increase in temperature from 5 °C to 20 °C and was inhibited at 27 °C (Edwards *et al.*, 1998).

The low rust incidence under TR (23-18 °C) compared to under TR (27-22 °C) was mainly due to limitation of *H.vastatrix* sporulation by temperature. TR (27-22 °C) was the thermal regime under which cultural practices with nitrogen fertilisation and agroforestry versus full sun field conditions had the largest impact on rust incidence. Hence, the presentation of the results will be focused on this thermal regime.

2.4.4.2 Low light intensity and high nitrogen fertilisation slowed down infection and sporulation in the inbred line Caturra

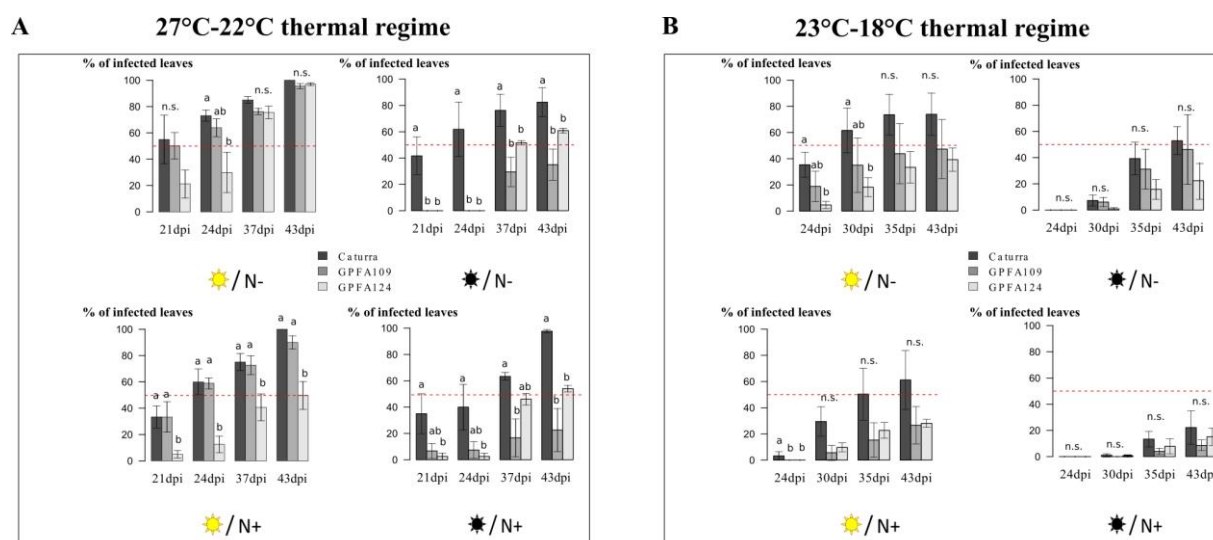


Fig. 13: Variations in the percentage of leaves infected by *H.vastatrix* during the time course of the infection under different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation in three different genotypes. A. The 27 °C-22 °C thermal regime. B. The 23 °C-18 °C thermal regime. For each thermal regime, four treatments were studied $\star/N-$ $\star/N+$ $\star/N+$ $\star/N+$ corresponding respectively to high light intensity (1000 PAR) / low nitrogen fertilisation, low light intensity (300 PAR)/ low nitrogen fertilisation, high light intensity(1000 PAR) / high nitrogen fertilisation, low light intensity(300 PAR)/ high nitrogen fertilisation. The inbred line Caturra and the two hybrids GPFA109 and GPFA124 are respectively in black, dark grey and light grey. The red dotted line represents 50% of infected leaves. The data are means of the percentage of infected leaves \pm SD (n=4). Different letters denote significant differences between the genotypes within each treatment according to Tukey's test ($P < 0.05$). ns: non-significant differences. Low light intensity reduces the speed of infection. The hybrids were less rapidly affected by rust than Caturra, especially under TR (27-22 °C) and under low light intensity.

Under TR (27-22°C), low light intensity delayed infection in Caturra (**Fig. 13A**). The mean percentage of infected leaves reached 66% at 24 dpi under high light intensity whereas only 50% of the leaves were infected under low light intensity on average over the two nitrogen fertilization levels. In Caturra, infection was slowed down by high nitrogen input (**Fig. 13A**). At 24 dpi, the mean percentage of infected leaves was 50% with high nitrogen

inputs versus 67% with low nitrogen inputs on average over the two light intensity levels. The pattern was the same under TR (23-18 °C), *i.e.* infection was slower under the lowest light intensity and faster under a low nitrogen fertilisation even when sporulation was very weak (Fig. 13B).

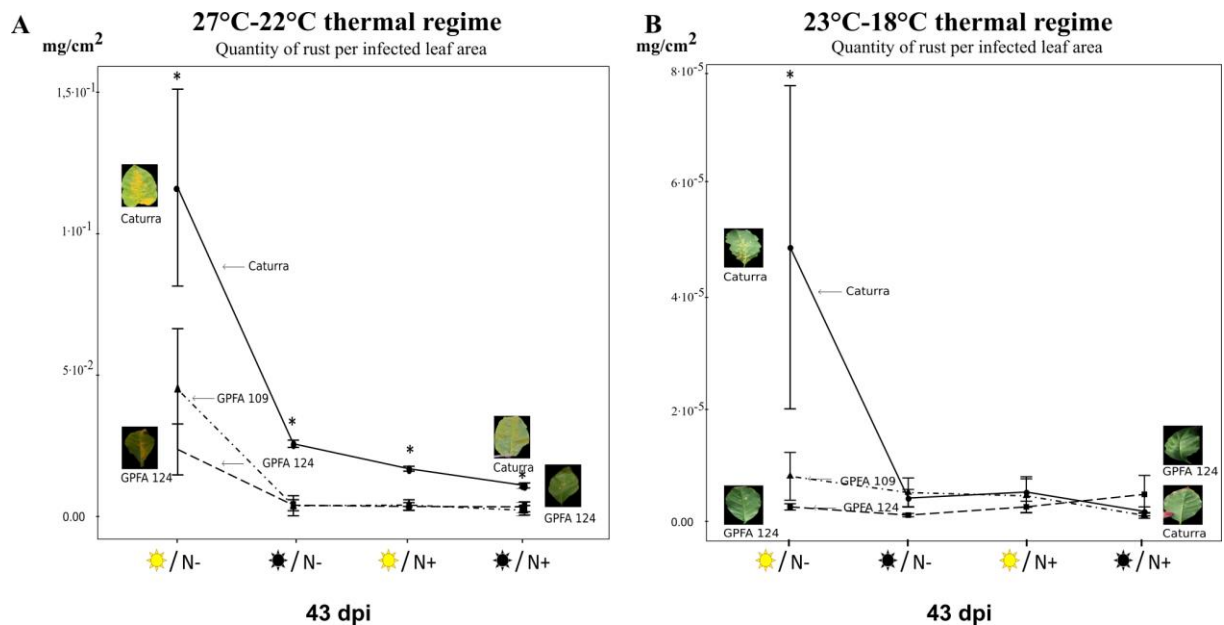


Fig. 14: Quantity of rust per infected leaf area (also named ‘sporulation’) produced by *H.vastatrix* under different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation in three different genotypes. A. The 27 °C-22 °C thermal regime. B. The 23 °C-18 °C thermal regime. NB: The scale of the two graphs is different. For each thermal regime, four treatments were studied $\star/N-$ $\star/N+$ $\bullet/N-$ $\bullet/N+$ corresponding respectively to high light intensity (1000 PAR) / low nitrogen fertilisation, low light intensity (300 PAR)/ low nitrogen fertilisation, high light intensity(1000 PAR) / high nitrogen fertilisation, low light intensity (300 PAR)/ high nitrogen fertilisation. Circles represent the inbred line Caturra, triangles the hybrid GPFA109 and squares GPFA124. The data are means of the rust weight harvested on the coffee plant 43 days post inoculation per infected leaf area \pm SD (n=4). Within each treatment, means for a genotype followed by an asterisk are significantly different according to Tukey’s test ($P<0.05$). High light intensity combined with low nitrogen fertilisation led to higher sporulation. Whatever the agronomic condition applied, sporulation was significantly lower in the hybrids than in the inbred line.

The quantity of sporulation was affected in the same way by nitrogen and light intensity, suggesting that lower rust penetration and/or colonisation of host tissue limited sporulation (Fig. 13 and Fig. 14). However it was not the only factor that limited sporulation quantity. Under TR (27-22 °C) and high light intensity, minor differences in the time course of infection between the different levels of nitrogen fertilisation led to a marked increase in the quantity of sporulation with low nitrogen fertilisation suggesting a higher quantity of spores

per lesion (**Fig. 13A**, **Fig. 14A**). Whatever the thermal regime, high light intensity combined with low nitrogen fertilisation led to a significantly higher quantity of rust at 43 dpi compared to with the other treatments (**Fig. 14**). These results suggest that agroforestry practises associated with sufficient nitrogen fertilisation could limit rust infection in the susceptible inbred line Caturra.

Avelino et al. (2006) monitored the development of rust epidemics in 73 plots in Honduras focussing on coffee plant characteristics, crop management and the environment. These authors showed that yield and fertilisation had the most effect on coffee rust. No fertilisation in the plots with good fruit yields was in most cases associated with high rust values. Nitrogen is an essential macronutrient for optimum coffee growth and is an essential component of fertilisation in coffee culture. Hence, our study focus on nitrogen fertilisation. The effect of N on disease development has been shown to vary in different studies, suggesting that the effect of N-supply on susceptibility is pathogen-specific (Dordas, 2008). Ramalho et al. (1997) showed that N starvation associated with high light exposure caused a marked reduction in photosynthetic capacity of coffee plants, and concluded that nitrogen availability is a key factor in acclimation to high light intensity. This less favourable physiological status could explain the high incidence of rust in our study when high light intensity was combined with low nitrogen fertilisation. Avelino et al. (2006) found that shade enhanced rust infection, which seems to contradict our results. However, in the study in Honduras, shade mainly affected the rust germination stage by providing a humid environment, low intensity light and buffer temperatures. In our study, all the coffee plants were kept in the same conditions during germination to avoid any effect of environmental conditions on germination. Germination rates have been measured in vitro and shown to be similar under all treatments. In our study, the lower percentage of infected leaves under low light intensity suggests a lower penetration rate or a lower host tissue colonisation of *H.vastatrix* under shade. Silva et al. (2002) compared the growth of *H.vastatrix* in susceptible and resistant *C. arabica* combining cytology and biochemistry. They demonstrated that the percentage of germinated urediospores and of appressoria formed over stomata and also the rust growth inside leaf tissues were similar in resistant and susceptible leaves until the 3rd day after the inoculation. After the formation of at least one haustorium, the fungus ceased its growth with higher frequency in the resistant leaves. They observed the first sign of resistance: hypersensitive host cell death (HR), host cell wall autofluorescence and haustoria encasement with callose and β -1,4-glucans but in lower percentage in susceptible plants. They

also detected by biochemical analysis a stimulation of PAL activity in all genotype, however in susceptible material, it was delayed and did not prevent fungal growth and sporulation. About 5–7 days after the inoculation, ultrastructural observations revealed the accumulation of a material partially crystallized in the intercellular spaces around the senescent hyphae. This intercellular material was only observed in the resistant plants. Using this methodology could be very interesting to understand the influence of low light intensity in rust penetration and colonization.

2.4.4.3 In the hybrids, infection was delayed and resulted in less sporulation

Whatever the thermal regime and the combination of light intensity and nitrogen fertilisation, rust infection was slower in the hybrids than in the inbred line (**Fig. 13**). The time course of infection was very similar in the two hybrids under all treatments except one. In the case of TR (27-22 °C), under high light intensity, the time course of the infection in GPFA 109 hybrid was very similar to that in Caturra, whereas infection was much slower under low light intensity compared to in the inbred line (**Fig. 13A**). The difference in the time course between the inbred line Caturra and the hybrids was maximized under TR (27-22 °C) with low light intensity and low nitrogen fertilisation (**Fig. 13A**). The latent period lasted approximately 21 days for Caturra versus 37 days for the hybrids. The penetration or colonisation of host tissue was strongly limited in the hybrids. The superiority of the hybrids in the shade was expressed by the less intense rust attack compared to Caturra. It is noteworthy that F1 hybrids were affected by nitrogen and light intensity in a similar way to Caturra. Hence, infection was slower under low light intensity and faster under low nitrogen fertilisation (**Fig. 13**).

Under TR (27-22 °C), the quantity of rust produced per infected leaf area was always significantly lower in the hybrids than in the inbred line Caturra (**Fig. 14A**). Regardless of the combination of light intensity and nitrogen fertilisation, the quantity of rust was similar in the two hybrids. Under TR (23-18 °C), the quantity of rust produced was significantly lower in the hybrids than in the inbred line only when the coffee plants were grown under high light intensity and low nitrogen fertilisation (**Fig. 14B**). The hybrids were more homeostatic in the quantity of rust than the inbred line Caturra (**Fig. 14**).

Other authors have drawn contradictory conclusions about the better resistance of hybrids to disease. Groszmann et al. (2015) showed that the better growth of the Arabidopsis hybrids reduced basal defence gene activity but did not affect their defence ability against

Pseudomonas syringae compared to that of their parents. Conversely, a study on willow leaf rust showed that the hybrids were more susceptible than their parents (Roche and Fritz, 1998).

Under the TR (27-22 °C) thermal regime, which will probably prevail in the Arabica cultivation area in few years, the time course of the infection was delayed and sporulation was slower in the hybrids regardless of the combination of light intensity and nitrogen fertilisation (**Fig. 13, Fig. 14**). Under low light intensity, the penetration or colonisation of host tissue was strongly limited thereby reducing rust sporulation. Under high light intensity, whereas the limitation of host tissue penetration or colonisation in the hybrids was less pronounced, the quantity of rust sporulation was still lower, perhaps due to fewer spores per lesion in the hybrids. These results highlight the superiority of the hybrids with respect to rust infection in agroforestry systems, because both the penetration/colonisation of host tissue and the intensity sporulation are limited.

2.4.4.4 Coffee rust sporulation can be partly explained by indicators of physiological status

To investigate the link between indicators of the physiological status of coffee plants before inoculation and rust incidence, TR (27-22 °C) and on the quantity of rust per infected leaf area as an indicator of rust incidence have been considered.

Chlorophyll *a* fluorescent transient of dark adapted leaves was performed at the end of the light period (from ZT9 to ZT11) before inoculation with *H.vastatrix*. Chlorophyll *a* fluorescence measurements provide indirect information about the physiological condition of plants. The JIP test has been used to analyse the polyphasic rise of the chlorophyll *a* fluorescence transient (OJIP) (Strasser and Strasser. 1995). It allows the evaluation of the physiological condition of photosystem II (PSII) and photosynthetic electron transport chain components. It has been investigated if the different combinations of light intensity and nitrogen fertilization led to different behaviour in terms of photon absorption, photon trapping, electron transport and energy dissipation, and if these adaptive behaviours were correlated with rust sporulation. As previously shown, low light intensity strongly limited host tissue penetration / colonisation in the hybrids (see section 2.4.4.3). Hence, to study the link between indicators of the physiological status of coffee plant before inoculation and the quantity of rust sporulation, the high light intensity treatment highlighted in red in **Fig. 15** has been particularly studied.

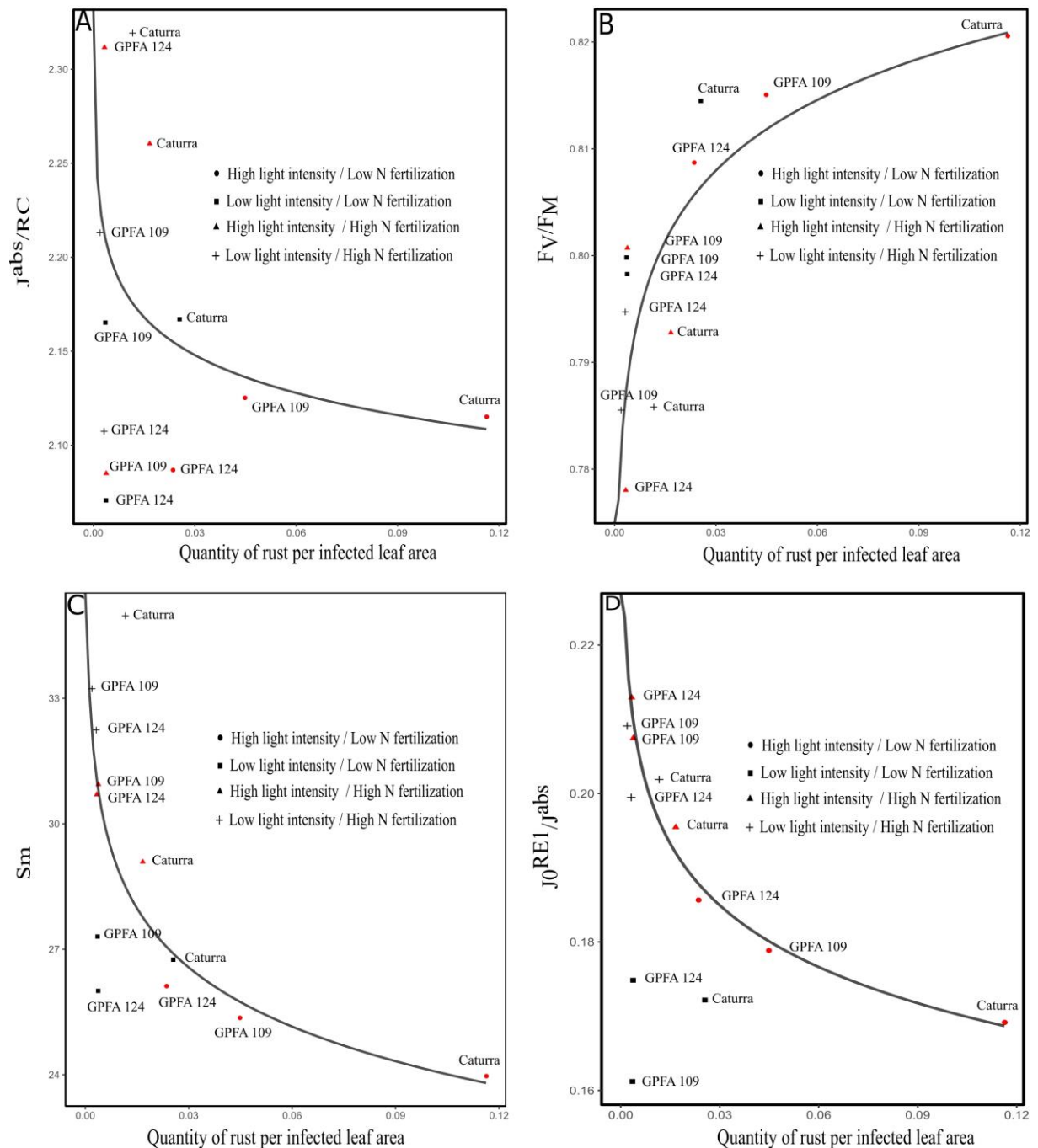


Fig. 15: Correlation between parameters derived from Chlorophyll a fluorescence induction curve and quantity of rust harvested on three *Coffea arabica* genotypes grown with different combinations of light intensity and nitrogen fertilisation under TR (27-22° C). A. The rate of photon absorption per PSII (Jabs / RC). The points corresponding to light treatment (in red) were fitted by the equation $y = -0.07 \cdot \log(x) + 2.05$; residual standard error: 0.091 B. The maximum quantum yield of primary photochemistry (FV/FM). The points corresponding to light treatment (in red) were fitted by the equation $y = 0.02 \cdot \log(x) + 0.84$; residual standard error: 0.009 C. The normalized area proportional to the number of electron carriers per electron transport chain. The points corresponding to light treatment (in red) were fitted by the equation $y = -4.7 \cdot \log(x) + 19$; residual standard error: 0.08 D. The quantum yield of the electron transport flux until the PSI electron acceptors (JORE1/Jabs). The points corresponding to light treatment (in red) were fitted by the

equation $y = -0.03 \cdot \log(x) + 0.14$; residual standard error: 0.003. Under high light intensity, parameters derived from Chlorophyll a fluorescence induction curve appear to be good indicators of the risk of rust infection.

Under the condition leading to higher rust incidence, the quantity of photon absorbed per PSII ($J_{\text{abs}} / \text{RC}$) was low (**Fig. 15A**). However, the trapping flux/ absorption flux (F_v/F_M) was high, meaning that the majority of the photons absorbed were trapped and very little energy flux was dissipated by processes other than trapping, such as heat dissipation (**Fig. 15B**). Therefore, during exposure to full sunlight or when environmental conditions restrict plant growth, leaves are unable to utilize all the photosynthetically active radiation absorbed and massive levels of excess excitation energy are encountered. This excess energy has the potential to be transferred into oxygen leading to ROS production and causing damage to the plant. One key mechanism to avoid photooxidative damage is the dissipation of excess energy as heat in the antenna pigment complexes of PSII before it reaches the PSII reaction centres (Demmig-Adams and Adams, 2006). When nitrogen deficiency is associated with high light intensity, excess energy is further increased by affecting biochemical reactions in the stroma, thereby reducing the activity of carboxylating enzymes, activities resulting in decreased CO_2 fixation capacity (Correia *et al.*, 2005). As a result, in our study, because coffee plants did not evacuate excess energy, ROS was probably produced, causing damage to the plant and explaining the high incidence of rust. Our results are consistent with those of DaMatta *et al.* (2008), who tested different source-sink balances in field-grown coffee trees. These authors found higher values of F_v/F_M for leaves sampled in March on coffee trees under higher sink demand compared with leaves on coffee trees from which 50% of coffee fruits had been removed. In our study, some parameters pointed to impairment of the electron transport chain under the treatment which led to higher rust incidence (**Fig. 15C**, **Fig. 15D**). Sm, assessing the number of electrons passing through the electron transport chain, was negatively correlated with the subsequent quantity of sporulation (**Fig. 15C**). $J_0^{\text{REI}}/J^{\text{abs}}$ corresponding to the rate of electron transport from QB to PSI acceptors had low values. $J_0^{\text{REI}}/J^{\text{abs}}$ is assumed to provide insight into the cyclic electron flux which can limit photooxidative stress by favouring the ATP to NADPH output ratio (Ripoll *et al.*, 2016). The negative correlation between $J_0^{\text{REI}}/J^{\text{abs}}$ and the quantity of rust sporulation reflects a decline in the cyclic flux, which favours rust sporulation by increasing photooxidative stress. (**Fig. 15D**).

Table 1: Influence of two levels of nitrogen fertilisation on indicators of the physiological state of three different coffea arabica genotypes under TR (27-22 °C) and high light intensity. Two treatments were studied: \star/N^- \star/N^+ corresponding to respectively high light intensity (1000 PAR) / low nitrogen fertilisation and high light intensity (1000 PAR) / high nitrogen fertilisation. The data are means \pm SD (n=3). Different letters denote significant differences between the two treatments according to Tukey's test ($P < 0.05$).

PARAMETERS	CATURRA		GPFA 109		GPFA 124	
	\star/N^-	\star/N^+	\star/N^-	\star/N^+	\star/N^-	\star/N^+
HEXOSES/SUCROSE	0.85 ± 0.09 a	0.41 ± 0.2 b	0.36 ± 0.2 a	0.49 ± 0.1 a	0.46 ± 0.1 a	0.57 ± 0.08 a
SUCROSE	3.9 ± 0.3 a	4.08 ± 0.2 a	2.3 ± 0.07 a	2.57 ± 0.2 a	3.4 ± 0.2 a	3.19 ± 0.2 a
STARCH	2.74 ± 0.8 a	1.7 ± 0.4 a	0.48 ± 0.04 a	0.52 ± 0.008 a	1.07 ± 0.2 a	1.05 ± 0.3 a
NH ₄	120 ± 6 a	142.4 ± 7.7 a	159.3 ± 1 a	177.1 ± 1 a	177 ± 6.1 b	235.4 ± 4.2 a
C/NH ₄	0.4 ± 0.019 a	0.33 ± 0.017 b	0.30 ± 0.02 a	0.27 ± 0.026 a	0.26 ± 0.009 a	0.20 ± 0.0034 b
MANGIFERIN	0.43 ± 0.01 a	0.29 ± 0.045 b	0.65 ± 0.07 a	0.66 ± 0.03 a	0.42 ± 0.05 a	0.42 ± 0.025 a
FLAVONOIDS	0.99 ± 0.1 a	0.71 ± 0.09 b	1.06 ± 0.05 a	1.17 ± 0.06 a	0.84 ± 0.1 a	0.88 ± 0.02 a
DICQA	0.46 ± 0.02 b	0.54 ± 0.025 a	0.80 ± 0.025 a	0.79 ± 0.07 a	0.69 ± 0.05 a	0.7 ± 0.09 a
CQA	3.9 ± 0.07 a	3.37 ± 0.17 a	3.8 ± 0.06 a	4 ± 0.19 a	4.2 ± 0.28 a	4.2 ± 0.021 a

Therefore, in Caturra, which was highly impacted by rust (high light intensity and low nitrogen fertilisation), the hexose to sucrose ratio was significantly higher, reflecting strong inhibition of sucrose biosynthesis followed by the accumulation of hexoses (Table 1). Despite the high hexose: sucrose ratio, sucrose content was high, suggesting poor-sucrose export efficiency. Accumulation of soluble sugars negatively regulates photosynthesis gene expression including expression of Calvin cycle genes (Couée *et al.*, 2006). There probably was an imbalance between the excitation energy and the quantity of NADPH produced and, on the other hand, the electron flux used by the Calvin cycle. This imbalance increased ROS production even more through poor recycling of NADP⁺. This result was corroborated by the high starch content (table 1). Starch accumulation is a mechanism which prevents down regulation of photosynthesis by providing an outlet for photosynthetic end-products when exports fail to evacuate them effectively. Excessive starch could therefore be toxic (DaMatta *et al.*, 2008). The accumulation of soluble sugars could be due to low nitrogen fertilisation. In tomato, it has been demonstrated that N-deficient leaves increase the accumulation of starch and major soluble sugars and decrease accumulation of amino acids (Sung *et al.*, 2015). In

phenolic compounds, which are assumed to be defense compounds, the concentration of mangiferin and flavonoids before inoculation was higher in Caturra, which was highly impacted by rust (high light intensity and low nitrogen fertilisation) suggesting a stress status but also pointing to the compounds' inefficiency against rust (Table 1, **Fig. 14A**). However, the concentration of di CQA, which is assumed to be a powerful antioxidant, was lower.

Whereas parameters related to physiological conditions of PSII and photosynthetic electron transport chain components seemed to explain the differences in the quantity of rust sporulation in Caturra and in the two hybrids under high light intensity, the behaviour of the hybrids with respect to metabolic content appeared to be very different from that of Caturra (Table 1). GPFA 109 and GPFA 124 hybrids showed better homeostasis for all metabolites. However, the nitrogen utilization was more efficient in the hybrids than in Caturra, especially in GPFA 124. Regardless of the genotype, a higher leaf C to NH₄ ratio was associated with higher quantity of rust per infected leaf area (Pearson correlation coefficient value: 0, 58; p-value: 0, 04). The C: N ratio has been widely studied and is considered to be a good indicator of the trade-off between growth and defense (Royer *et al.*, 2013).

2.4.5 Conclusions

The results obtained in controlled conditions demonstrate that high temperature favours pathogen development but also increases the impact of agricultural practices such as nitrogen fertilisation and shade on the incidence of CLR in susceptible varieties. Higher temperature is one of the meteorological anomalies caused by ongoing climate change. Under the 27-22 °C thermal regime, shade and high nitrogen fertilisation limited rust incidence by affecting both host tissue penetration / colonisation and sporulation intensity. Moreover, vigorous varieties were less infected and more homeostatic than conventional varieties. The superiority of hybrids with respect to rust attack was particularly clear under the 27-22 °C thermal regime (the thermal regime which will probably prevail in *Arabica* cultivation areas in a few years) and under low light intensity. Because of the different behaviour of the hybrids compared to Caturra, metabolites could not be used as predictors for either Caturra or the hybrids. However we recommend studying the C: NH₄ ratio, which seems to predict the amount of sporulation in real conditions fairly well. Among the many parameters studied, those related to the physiological condition of photosystem II and photosynthetic electron transport chain components appeared to be useful indicators of the physiological status of the coffee plant and

able to predict the capacity of the plant to resist the disease. To our knowledge, until now, Chlorophyll *a* fluorescence imaging has already been used to study physiological responses after pathogen attacks but not yet to assess the physiological state before infection. It could be a simple, non-destructive, inexpensive and rapid tool to detect the physiological state which will lead to high rust sporulation. Genetic resistance to rust based on major SH genes is becoming progressively less durable. Based on preliminary observations in the field (by the authors of the present study) suggesting that susceptible F1 hybrids are less severely attacked by coffee leaf rust than pure lines, we confirm this result in controlled conditions. We showed that under shade and sufficient nitrogen fertilisation, rust incidence is very low on F1 hybrid. Hence, our work suggests that vigorous varieties (mainly F1 coffee hybrids) combined with a shaded system and appropriate nitrogen fertilisation could be a useful part of an agro-ecological approach to controlling this disease. We consider that the current Arabica breeding programs mainly devoted to the selection of resistant varieties should also consider these results and reorient their objectives toward obtaining vigorous and resilient varieties.

2.4.6 Acknowledgements

We would like to address special thanks to Christian Chaine, Rémy Michel and Eve Lorenzini technicians at Cirad, for their help, their kindness and their precious advices for the cultivation of coffee plants.

We acknowledge Nestlé Sustainability Fund for financial support.

2.4.7 Contribution

LT, JCB, HE, CL, JCHP, BB designed the study. LT, JCB, HE, BB contributed to sample harvest and data analysis. CC and LT contributed to starch and secondary metabolite analysis. SD and LT contributed to starch and sugar content analysis. LU helped with interpretation of chlorophyll fluorescence data. LT wrote the first draft of the manuscript, BB and JCB improved it and all authors revised it.

Partie 3. Etude du déterminisme moléculaire de la meilleure performance agronomique d'un clone d'hybride F1 de *Coffea arabica* via une approche de transcriptomique.

Article soumis à Plant Cell and Environment à la date de soutenance

3.1 Contexte

Au champ comme en conditions contrôlées, l'incidence de la rouille est moindre sur la variété hybride GPFA 124 que sur la variété lignée de référence Caturra. Nous avons montré dans la première partie de cette étude que l'état physiologique de l'hybride est différent de celui de la lignée. La publication de Ni et ses collaborateurs (2009) démontre que l'horloge interne d'un allotétraploïde ou d'un hybride chez *Arabidopsis* est dérégulée par rapport à celle des parents diploïdes conduisant à une production de chlorophylles et d'amidon bien supérieure et à un métabolisme énergétique accru. Shen et ses collaborateurs (2015) ont trouvé des résultats similaires en étudiant un hybride de riz, ce qui tend à montrer que la vigueur hybride est bien due, au moins en partie, à une dérégulation de l'horloge circadienne. Dans ce contexte, l'objectif de ce chapitre est de tester l'hypothèse de Ni chez *C. arabica* et vérifier si l'hybride possède un avantage photosynthétique substantiel dû à l'altération de son horloge circadienne quand on le compare à la variété lignée Caturra.

3.2 Stratégie

Les teneurs en chlorophylle et en amidon ont été mesurées à ZT0, ZT3, ZT6, ZT9 (soit 0h, 3h, 6h et 9h après le lever du jour) sur la variété lignée Caturra ainsi que sur l'hybride GPFA 124. L'état du photosystème II et de la chaîne de transport d'électron a été évalué de manière indirecte avec le fluorimètre Handy PEA par mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a*. Une approche RNA seq a permis de quantifier l'expression des gènes à ZT0, ZT6 et ZT12 et de réaliser une étude d'expression différentielle, complétée par des analyses de PCR quantitatives.

3.3 Conclusions

Confirmant l'hypothèse de Ni *et al.* 2009, nous avons montré une altération de l'horloge circadienne chez l'hybride GPFA 124 par rapport à la variété lignée Caturra corrélée à une teneur en chlorophylle et une efficacité photosynthétique chez l'hybride supérieure à Caturra. Nous avons montré que la différence de teneur en chlorophylle s'explique par une sur-expression des gènes impliqués dans sa biosynthèse ainsi qu'une sous-expression des gènes impliqués dans sa dégradation chez l'hybride GPFA 124. L'indice de performance total (PI_{tot}) mesuré grâce au Handy PEA, supérieur chez l'hybride, résulte d'une sur-expression de certains gènes du photosystème II. L'hybride présente un flux cyclique des électrons plus important qui lui permettrait de limiter les stress oxydatifs. Par ailleurs, on observe chez l'hybride une sur expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse du saccharose et de l'amylose (constituant non ramifié donc plus facilement mobilisable que l'amidon) ainsi qu'une sous expression du polymère ramifié entrant dans la composition de l'amidon : l'amylopectine. L'approche transcriptomique nous a ainsi permis, à la fois, de montrer que l'hypothèse de Ni s'applique chez *C. arabica* mais également d'aller plus loin dans la compréhension, des bases moléculaires de la meilleure efficacité photosynthétique et d'une utilisation des ressources davantage optimisée chez les hybrides comparé à la variété lignée Caturra.

3.4 Article

A performant Arabica F1 hybrid shows an altered circadian clock coupled with a better photosynthesis efficiency.

Running title: Unravel the better agronomic performance of one Arabica F1 hybrid

Authors: Lucile Toniutti^{1,3,4,*}, Jean-Christophe Breitler^{1,3}, Charlie Guittin^{2,3}, Sylvie Doulebeau², Hervé Etienne^{1,3}, Claudine Campa^{2,3}, Charles Lambot⁴, Juan-Carlos Herrera Pinilla⁴ and Benoît Bertrand^{1,3}

¹ Univ Montpellier, CIRAD, IPME, Montpellier, France

² Univ Montpellier, IRD, IPME, Montpellier, France

³ IPME, Univ Montpellier, IRD, CIRAD, Montpellier, France.

⁴ Nestlé R&D Tours, 101 AV. G. Eiffel, Notre Dame d'Oe', BP 49716, 37097 Tours Cedex 2, France

*Corresponding author: Lucile Toniutti, E-mail, lucile@toniutti.net

3.4.1 Abstract

In a context of climate change threatening plant productivity, the management of disease is a challenging practical problem. The use of fungicides or the delivery of resistant variety based on major resistant genes are used since many years but seems unsustainable. Developing healthy plant more resilient should be part of a more sustainable alternative. The main objective of this study was to test the hypothesis that an alteration of circadian clock and carbon metabolism in Arabica coffee varieties may explain the higher vigour of certain varieties leading to a healthy plant. We compared phenotypic variables and the expression of genes involved in circadian clock, chlorophyll metabolism and photosynthesis of two genotypes: one F1 hybrid selected for high productivity and good health in various environments including a reduced rust incidence and the variety Caturra considered as a standard in terms of productivity in many producing countries and highly susceptible to rust. We showed an alteration in the hybrid's circadian clock leading to higher chlorophyll content,

increased photosynthetic electron transport efficiency and a better carbon partitioning. Together, these data offer new insights into a better understanding of the growth vigor in an intraspecific hybrid which are of direct relevance to crop production.

Keyword index: *Coffea Arabica*, circadian clock, chlorophyll *a* fluorescence, transcriptomic approach, plant vigor.

3.4.2 Introduction

Since the middle of the last century, increasing human population and economic development will continue to put pressure on agricultural systems for increased crop yields. A particular concern for the growing intensity of agricultural practices, or at least maintaining production levels in a context of climate change, is the management of pests and diseases, which can account for up to 25% of preharvest crop losses in agricultural areas managed with well-developed crop protection technologies (Oerke 2006; Godfray & Garnett 2014). More specifically, in the field of Arabica coffee culture, global warming and unstable climate affect the plant but also the behavior of coffee pests and diseases. From 2008 to 2013, more intense coffee rust epidemics than those previously observed occurred in Mesoamerica from Colombia to Mexico, including Peru, Ecuador and some Caribbean countries. Meteorological anomalies, caused by the ongoing climate changes, are considered as one of the main factors contributing to the emergence of the rust epidemic in 2012-2013, and to affect both the pathogen and the physiological status of the coffee tree (Cristancho et al. 2012; Rozo et al. 2012; Avelino et al. 2015). Management of the disease is a challenging practical problem made worse because tropical climates are favorable to diseases development and also because coffee being a perennial crop lead to a presence of susceptible host tissue over long periods (Ploetz 2007). Rational controls based on the use of fungicides at specific disease level threshold are effective in coffee leaf rust management (Avelino & Savary 2002). However, their high cost made them inaccessible for many producers (Maccook & Vandermeer 2015). These products are not a sustainable solution because intensification of agricultural practices showed within the four last decades increasing environmental and health problems (Birch, Begg, & Squire, 2011). Other analysis suggested also that despite the massive increase in the use of pesticides for more than 50 years, the overall proportion of crop losses due to pests and diseases has not decreased (Oerke 2006; Popp, Peto & Nagy 2013). In addition, chemical

control strategies are facing growing public rejection and are becoming increasingly regulated owing to their negative impacts on human health and ecosystems (Birch et al. 2011).

In this difficult context, alternative phytosanitary protection can be put in place and rely on interactions in the ecosystem to regulate pathogens and pests, as well as the deployment of a multitude of non-chemical management practices (Zehnder et al. 2007; Virginio Filho & Astorga Domian 2015). From this point of view, holistic plant health could be an important part of the solution, if we consider that a plant can be regarded as healthy as long as its physiological performance, determined by its genetic potential and environmental conditions, is maintained (Döring et al. 2012). The focus should be done on developing and maintaining healthy plants, so they are more resilient and more resistant by adjusting themselves to the environmental conditions. This idea would consist in cultivating plants using better their resources to address the vagaries of the environment while ensuring that productivity will be sufficiently high to fulfill farmer's economic needs.

Hybrid F1 plants are widely used in allogamous plant since the 1930s because of their heterosis, i.e. their superior performance compared to parental lines in traits such as growth rate, biomass, biotic and abiotic stress resistance and yield (Duvick 2001). In autogamous plant, the use of F1 hybrid was less common because of the weaker heterosis (Gallais 2009). The advantages of hybrid cultivars, even for the autogamous *C. arabica*, were demonstrated for the first time in a Kenyan breeding program (Van Der Vossen et al. 2015). In Central America, Bertrand et al. (2005) assessed the heterosis of F1 hybrid derived from crosses between wild Sudan-Ethiopian and American cultivars between 22 and 47%. They concluded in a following study that heterosis gave hybrids an advantage over lines in term of productivity without increasing outputs, but also in terms of yield stability due to their homeostasis (Bertrand et al. 2011). Recently Echeverria-Beirute et al. (2017) showed in field conditions that a vigorous F1 hybrid (H3 hybrid) was more resistant to rust than the traditional pure line variety Catuai. Considering the health of a plant defined as the ability to carry out its physiological functions to the best of its genetic potential, the coffee hybrids are undoubtedly healthier than the reference pure line varieties regardless of the environment (Bertrand et al. 2011; Döring et al. 2012; Van Der Vossen et al. 2015).

Although hybrid vigor has been widely used in agriculture since the beginning of the last century, the molecular mechanism for this remains largely elusive. Recently, altered expression of circadian clock genes while maintaining the clock period was linked to hybrid vigor. Ni et al. (2009) showed that in *Arabidopsis* hybrids, increased photosynthetic and metabolic activities are linked to altered expression of circadian clock regulators LATE

ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1), TIMING OF CAB 1 (TOC1) and GIGANTEA (GI). The circadian clock of F1 hybrids are deregulated compared to parents leading to higher chlorophyll and starch production and an enhanced energetic metabolism (Miller et al. 2012). In maize, higher levels of carbon fixation and starch accumulation in hybrids are associated with altered temporal gene expression of two CCA1 homologs. In these hybrids, CCA1 proteins target thousands of output genes early in the morning, as if the hybrids wake up early to promote photosynthesis, starch metabolism and biomass accumulation (Ko et al. 2016). Similar results were obtained with monocots. In super-hybrid rice, yield-related QTLs are associated with gene expression changes in the circadian clock and light signaling pathways (Song et al. 2010). Recently, Shen and collaborators (2015) showed that three circadian clock genes, OsCCA1, OsTOC1, and OsGI are expressed in an above-high-parent pattern (AHP) at seedling stage in rice F1 hybrids as well as downstream genes involved in the chlorophyll and starch metabolic pathways suggesting that the circadian rhythm pathway may be also related to hybrid vigor in monocots. It is unknown whether a similar mechanism mediates hybrid vigor in *Coffea arabica* hybrids.

The link between hybrid vigor and photosynthesis is particularly interesting because adaptive responses to environmental stresses are often constrained by resource availability (Kangasjärvi et al. 2012). Accurate allocation of limited resources between growth and defense is critical for plant fitness. Thus, diversion of resources to growth can limit investment in defense, and allocation to defense can reduce growth and competitive ability against neighboring plants (Ballaré et al. 2012; Casal 2013). Therefore, plants must strike a precise balance in their responses to abiotic and biotic stress (Kangasjärvi et al. 2012; Ballaré 2014). Increase photosynthetic capacities provides plants more resources to deal with abiotic constraints and fight effectively against pests and diseases. A better understanding of the relationships between photosynthesis, energy metabolism and circadian cycle would be particularly interesting to explore new avenues leading to develop coffee varieties better adapted to climate change and displaying good health in various growing environments.

In this paper, we hypothesized that an alteration of circadian clock and carbon metabolism pathway may explain the higher vigor of certain coffee varieties. To test this hypothesis, we compared phenotypic variables and the expression of genes involved in circadian clock, chlorophyll metabolism and photosynthesis of two genotypes: the F1 hybrid GPFA 124 selected for high cup quality, high productivity and excellent health in various

environments and the variety Caturra considered as a standard in terms of productivity and cup quality in many producing countries and recognized as highly susceptible to rust.

3.4.3 Material and method

3.4.3.1 Plant material and growth conditions

Two genotypes were studied: one inbred line *C. arabica* var. Caturra and one Arabica hybrid: GPFA 124. The Caturra seeds came from the La Cumplida research centre (Matagalpa, Nicaragua). The intraspecific Arabica hybrid GPFA124 was vegetatively propagated by somatic embryogenesis at the Nestlé R&D laboratory (Tours, France). GPFA 124 hybrid was selected for high cup quality, high productivity and excellent growth behavior. The plants were cultivated in a glasshouse under natural daylight (65-75% humidity, 12 h day/12 h night) at IRD (Montpellier, France) in 3 L pots containing a GO M2 (Jiffygroup) potting soil mixture and watered as necessary.

Leaf samples were collected for RNA extraction and chemical analyses at Zeitgeber time (ZT) point ZT0 (sunrise), ZT3, ZT6, ZT9, ZT12 (sunset), ZT15, ZT18, ZT21, and ZT24. For RNAseq extraction, leaves were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. For chemical analyses, leaves were sampled, flash frozen in liquid nitrogen and then freeze-dried. During sampling operations three biological replicates were performed for chemical analysis and for RNAseq.

3.4.3.2 Starch extraction

The starch content of 30 mg of freeze-dried powder was determined using the total starch kit GOPOD (D-glucose, K-Gluc, Megazyme International, Ireland). After elimination of soluble sugars and of the soluble products of starch degradation, the residue was successively hydrolyzed into glucose units with α -amylase and amyloglucosidase. The resulting D-glucose was then degraded with glucose oxidase and the resulting hydrogen peroxide quantified by spectrophotometry at 510 nm after a last enzymatic reaction. Results are determined in triplicate and expressed as percentage of dry weight (DW).

3.4.3.3 Chlorophyll extraction

Chlorophyll extraction was performed at ZT6. Leaves were grounded in liquid nitrogen in a ball mill (Tissue Lyser, Qiagen) and extraction was carried out by stirring 60 mg of

leaves in 1,5 ml of acetone 80% (V/V) for 4h at 4°C in darkness. After centrifugation at 10 000 g and 4°C for 10 min, the supernatant was diluted ten times in acetone 80% (V/V). The chlorophyll content was calculated using spectrophotometric absorbance (A) at light wavelengths of 645 and 663 nm and 80% acetone as a control. Chlorophyll content was expressed as milligram of chlorophyll per gram of fresh leaves using the formula: Chlorophyll a (mg g⁻¹) = $12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$; Chlorophyll b (mg g⁻¹) = $22.9 \times A_{645} - 4.86 \times A_{663}$; Chlorophyll a+b (mg g⁻¹) = $8.02 \times A_{663} + 20.20 \times A_{645}$ (Graf *et al.*, 2010).

3.4.3.4 Chlorophyll a fluorescence

Chlorophyll *a* fluorescence measurements were conducted at ZT3 with a Handy PEA chlorophyll fluorimeter (Handy-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK) on mature leaves. Four fluorescence measurements per plant were performed. Leaves were dark-adapted for 20 min prior to measurement. When leaves kept in the dark are illuminated, chlorophyll *a* fluorescence intensity shows characteristic changes called fluorescence transient (Stirbet and Govindjee, 2011). Chlorophyll *a* fluorescence transients were induced by 1 s illumination with an array of six light-emitting diodes providing a maximum light intensity of 3000 PAR. The fast fluorescence kinetic (from F_0 to F_M , where F_0 and F_M are, respectively, the minimum and maximum measured chlorophyll fluorescence of PSII in the dark-adapted state) was recorded from 10 μ s to 1 s. Dark-adaptation allowed the PSII electron acceptor pool to be gradually re-oxidized to a point where all PSII reaction centers are capable of photochemistry. Fluorescent transients were analyzed using the JIP test developed by Strasser and Strasser (1995). The JIP test evaluates the balance between total energy inflows and outflows and provides the probable distribution of light energy absorption (ABS) between the events: trapping (TR), electron transport (ET) and dissipation (DI) (Kalaji *et al.* 2016). We analyzed in more details the performance index of Strasser (Strasser *et al.* 2004): PI_{total} , total performance index. PI_{total} reflects the potential for energy conservation from exciton to the reduction flux of PSI end acceptors. It is a multi-parametric expression that combines four parameters related to photosynthetic activity: (i) RC/ABS representing the density of active reaction (in the sense of quinine acceptor (QA) reducing) centers on an equal chlorophyll (absorption) basis; (ii) F_v/F_0 representing the performance of the light reactions for primary photochemistry, i.e the performance due to trapping probability; (iii) $(1-VJ)/VJ$ representing the performance of the dark reactions, i.e. the performance due to the conversion of excitation energy into photosynthetic electron transport; (iv) δRE_{10} representing the

efficiency with which an electron can move from the reduced intersystem electron acceptors to the PSI end electron acceptors (Strasser *et al.* 2004).

3.4.3.5 RNA extraction, RNA sequencing and bioinformatics analysis

RNA were extracted from 100 mg of leaves as described in (Breitler *et al.*, 2016)

Only samples taken at ZT0, ZT6 and ZT12 were sequenced. RNA sequencing (RNAseq) was carried out by the MGX platform (Montpellier GenomiX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier; www.mgx.cnrs.fr/). RNAseq libraries were constructed with the *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation* kit from Illumina. One microgram of total RNA was used for the construction of the libraries. The first step in the workflow involves purifying the poly-A containing mRNA molecules using poly-T oligo attached magnetic beads. Following purification, the mRNA is fragmented into small pieces using divalent cations under elevated temperature. The cleaved RNA fragments are copied into first strand cDNA using SuperScript IV reverse transcriptase and random primers. This was followed by second-strand cDNA synthesis. These cDNA fragments then go through an end repair process, the addition of a single 'A' base and subsequent ligation of the adapter. The products are then purified and amplified by PCR. The final cDNA libraries were validated with a Bioanalyzer (kit Standard Sensitivity NGS) and quantified by qPCR (ROCHE Light Cycler 480). Libraries were pooled in equal proportions, denatured with NaOH and diluted to 17 pM before clustering on 2 lane in a *flow cell*. Clustering and 100 nt single read sequencing were performed according to the manufacturer's instructions.

Image analyses and base calling were performed using the HiSeq Control Software and Real-Time Analysis component (Illumina). The quality of the data was assessed using fastqc from the Babraham Institute (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and the Illumina software SAV (Sequence Analysis Viewer). We obtained an average of 21 million single end reads per sample.

The 100 nt single reads were aligned to the *C. canephora* reference sequence for genomic sequences (Denoëud *et al.*, 2014), because the Arabica sequence is not yet available, and to chloroplast genome sequence of *Coffea arabica* L. (Samson *et al.*, 2007) using Tophat v2.1.1 (Kim *et al.*, 2013) with the following parameters: --read-mismatches 3 --read-gap-length 3 --read-edit-dist 3. Unmapped and multi-position matched reads were excluded from analyses, while uniquely mapped reads were counted for each gene model using Htseqcount for subsequent differential expression analysis by DESeq 2 (Love, Huber and Anders, 2014).

One average 75.4 % of sequenced reads were mapped per sample to the reference genome.

3.4.3.6 Validation of RNAseq by qRT-PCR analysis

In RNAseq studies, qRT-PCR is usually used for validation. Based on bibliographic data, we targeted three key genes of the circadian clock: *CcLHY* (Cc02_g39990), *CcGIGANTEA* (Cc10_g15270) and *CcLUX-ARRAYTHMO* (Cc06g20160), two genes involved in chlorophyll biosynthesis *CcPORIA* (Cc05_g12370) and *CcPORIB* (Cc05_g06850) and two genes involved in starch degradation *CcGWD1* (Cc11_g15490) and *CcISA3* (Cc10_g06640). PCR experiments were performed as previously described by Marraccini et al. (2012). Primers were designed using Primer3Plus web-based software (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). The specificity of the PCR products generated for each set of primers was verified by analyzing the T_m (dissociation) of amplified products. PCR efficiency (E) was estimated using absolute fluorescence data captured during the exponential phase of amplification of each reaction with the equation $(1+E)=10^{(-1/\text{slope})}$ (Ramakers *et al.*, 2003). Expression levels were calculated by applying the formula $(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$ where $\Delta C_{t,\text{target}}=C_{t,\text{targetgene}}-C_{t,CaGAPDH}$ and $\Delta\Delta C_t=\Delta C_{t,\text{target}}-\Delta C_{t,\text{references sample}}$, with the T_0 samples being used as references for each construct. Expression levels were normalized with the expression of the *CaGAPDH* gene (GB accession number GW445811) as the endogenous control (Alves *et al.*, 2017). The genes expression was measured at ZT0, ZT6 and ZT12. The relative log expression normalized data estimated from RNAseq had high correlation with that from the qRT-PCR ($r=0.80$; Supplementary Table S1).

3.4.3.7 Differential expression analysis

Before DE analysis, genes which sum of counts (by summing the counts by repetitions (3) and genotype (2) was below 45 were discarded. Reads were then standardized across libraries using the normalization procedure in DESEQ2 (Love, Huber and Anders, 2014). Comparison between the inbred line caturra and the hybrid GPFA124 was performed at ZT0, ZT6 and ZT12. Differential expression was considered at $p < 0.05$.

All genes of interest were compared using BLASTP against The Arabidopsis Information Ressource database (TAIR, www.arabidopsis.org) with an e -value cut-off of $1e-5$. We also

performed a BLASTP search against the *C. arabica* phytozome database with e value cut-offs of $1e-15$.

3.4.3.8 Statistics

All statistical analyzes were performed using R 3.2.4 software. A Student's test was performed to test the effect of genotype on the quantity of rust per infected leaf area at 43 dpi, handy pea parameters and metabolites (stats package). Tests for normality and equality of variance (Shapiro test and Levene test, car package) were performed. Alternatively, the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test was conducted (stats package).

A list of genes under circadian regulation in *Coffea arabica* has been settled using JTK software (data not published). A Fisher's exact test ($P < 0.05$) was used to determine if the circadian genes within the differential expressed gene set were present in greater numbers than expected by chance. Heat map was generated using the corrplot package in R (Wei, 2010). Genes were ordered following hierarchical clustering on the pearson correlation coefficient using ward method. Gene Ontology (GO) analysis was performed using singular enrichment analysis in agriGO V2.0 (Tian *et al.* 2017).

3.4.3.9 Rust trial

The inbred line Caturra and the hybrid GPFA 124 were cultivated in a phytotron (65-75% humidity, 12 h day/12 h night, day/night temperature: 27°C/22°C) at CIRAD (Montpellier, France) (Toniutti *et al.* 2017). They are not expected to carry any specific genetic resistance to prevalent rust races. Water was supplied every day and they were fertilized with 39 mg of MS/2 medium (Murashige & Skoog 1962), 3 mg of KCl and 35 mg of NH_4NO_3 once a week for 11 weeks *i.e.* a total of 134 mg of nitrogen. They received a photosynthetically active radiation (PAR) of 1000 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ mimicking the light intensity perceived in a full sun system. The inoculum was composed of a mixture of uredospores of *H. vastatrix* collected from Caturra, wild Ethiopian and Castillo coffee trees at the Cenicafé "Naranjal" experimental station located in the central coffee cultivation region in Colombia. This population of uredospores mimicked the field CLR races currently found in the field. Infestation protocol was described in Toniutti *et al.* 2017. The infestation was monitored macroscopically in quadruplicate using a completely random experimental design. The quantity of rust per infected leaf area produced by *H. vastatrix* was measured: at 43 dpi, the rust was harvested from each leaf of each coffee tree and weighted per tree. Leaf area was

measured on leaves with at least one sporulating lesion. The quantity of rust per infected leaf area represents the ratio of the weight of the rust to the cumulated infected leaf area per tree.

3.4.4 Results

3.4.4.1 The GPFA 124 hybrid is more vigorous and less affected by rust than the inbred line Caturra

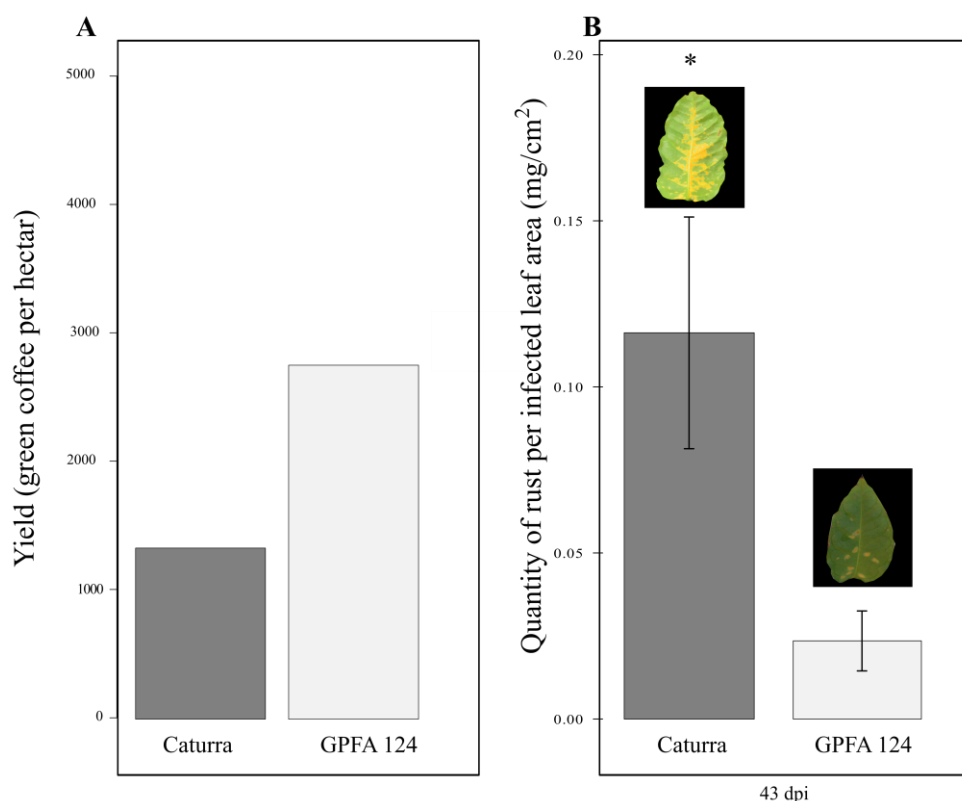


Fig. 16 Comparison of agronomic performance in two different genotypes A. Yield in field condition. Yield measured as green coffee per hectare results from field evaluations conducted in equator between 2004 and 2009. Caturra and GPFA124 are in dark and light gray respectively **B. Quantity of rust per infected leaf area (also named ‘sporulation’) produced by *H. vastatrix* 43 days post inoculation in abiotic stress condition (1000 PAR / low level of nitrogen fertilization).** The inbred line Caturra and the hybrid GPFA124 are respectively in black and light grey. The data are means of the rust weight harvested on the coffee tree 43 days post inoculation per infected leaf area \pm SD (n=4). Means for a genotype followed by an asterisk are significantly different according to student test ($P < 0.05$). The yield was higher and the sporulation was lower in the GPFA 124 hybrid compared to the inbred line Caturra.

In Ecuador, field evaluations conducted between 2004 and 2009 showed yield values of 1332.13 and 2756.8 kg of green coffee per hectare for Caturra and GPFA 124 respectively (Fig. 16A). The yield in GPFA 124 fields is every year twice as important. Moreover, less intense rust attacks have been observed in the hybrid than in the inbred line Caturra. To evaluate the level of resistance of the hybrid, a study conducted in controlled condition was

setup and showed the same result. Caturra and GPFA 124 were grown under abiotic stress condition (light intensity of 1000 PAR and low nitrogen fertilization) during 11 weeks prior inoculation with *H. vastatrix*. The latent period lasted 21 days for Caturra versus 37 days for the hybrid. The penetration or colonization of host tissues was strongly limited in the hybrids. The quantity of rust produced per infected leaf area 43 days post inoculation was 5 times lower in the GPFA 124 hybrid than in the inbred line Caturra (Fig. 16B).

3.4.4.2 Circadian clock and core components in *Coffea arabica*.

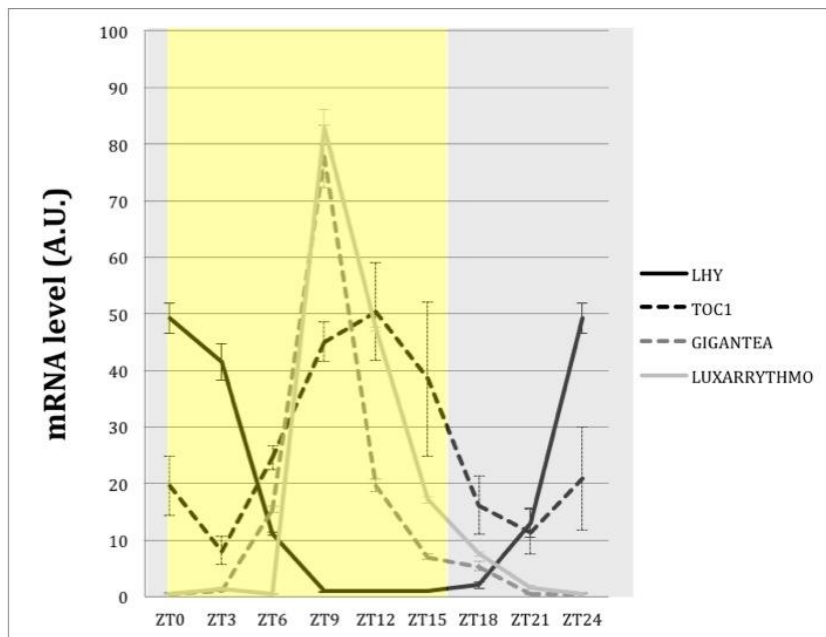


Fig. 17 : Daily expression of the central clock genes. Quantitative RT–PCR analysis of *CaLHY* (black line), *CaTOC1* (black dotted line), *CaGIGANTEA* (gray dotted line) and *CaLUX-ARRYTHMO* (Gray line) expression (*GaPDH* as a control) in a 24-h period (light/dark cycles) starting from dawn (ZT0). Normalization is relative to the maximum.

The core of the oscillator consists of one MYB-related gene *CaLHY* and *CaTOC1*. Other components expressed throughout the day interconnect with the core oscillator to form multiple feedback loops and a complex clock network. Because circadian genes expression was not known for coffee tree, QPCR analysis over 24 hour of 4 major components of the circadian clock (*CaLHY*, *CaTOC1*, *CaLUX-ARRYTHMO*, and *CaGIGANTEA*) were done to compare circadian rhythm of the core clock in *C. arabica* and *A. thaliana*. *CaLHY* and *CaTOC1* are antagonistic and their expression peaks at dawn and dusk respectively. As expected, *CaLUX-ARRYTHMO* and *CaGIGANTEA* expression peaked between noon and dusk. Circadian expression of core clock genes from morning and evening loop is perfectly similar to that described in the literature for other plant species (Fig. 17).

3.4.4.3 The higher vigor in the hybrid may be explained by an alteration of the circadian clock.

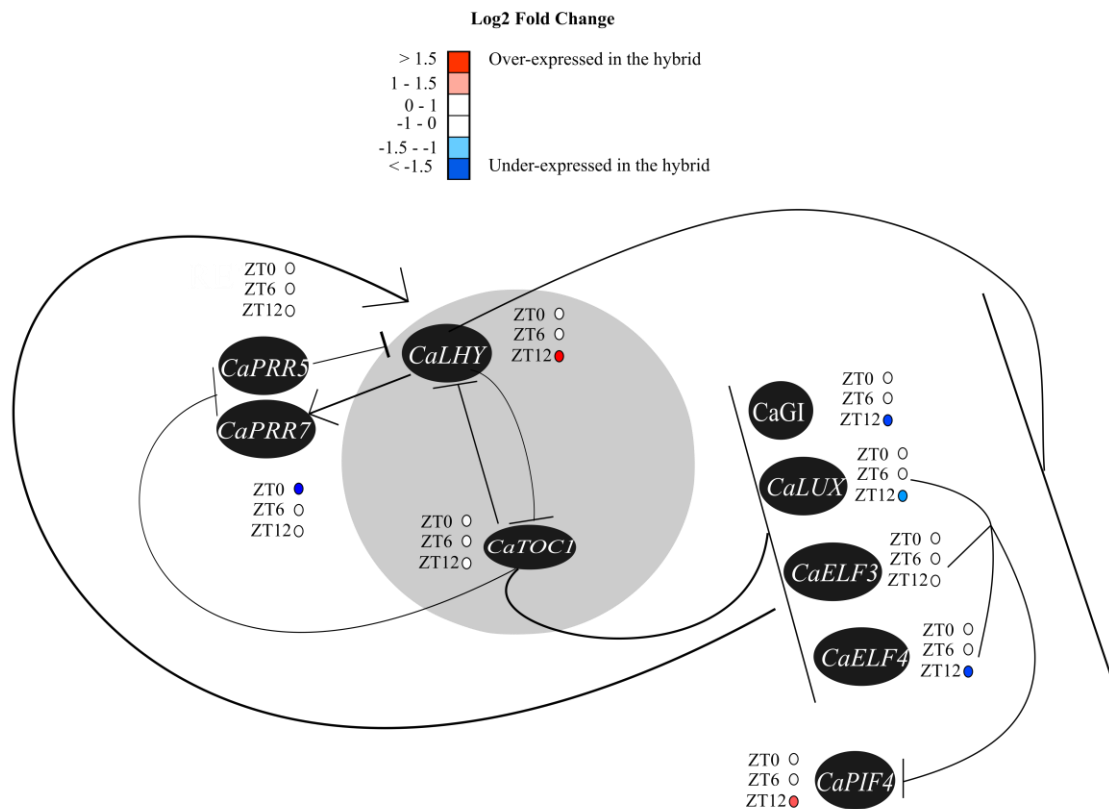


Fig. 18 Altered expression patterns of circadian clock genes in the F1 hybrid during the day. The core clock is represented in gray. Arrows represent activation and horizontal line repression. Levels of differential expression at ZT0, ZT6 and ZT12 between the inbred line Caturra and GPFA 124 hybrid are represented with color dots. Red and blue colors represent significant up and down regulation respectively in GPFA 124 hybrid compared to the inbred line Caturra (corrected Bonferroni p-value < 0.05). The genes represented are pseudo-response regulator 5 (*CaPRR5*; Cc02_g00820), pseudo-response regulator 7 (*CaPRR7*; Cc06_g03460), late elongated hypocotyl (*CaLHY*; Cc02_g39990), timing of cab expression 1 (*CaTOC1*; Cc04_g14990), *GIGANTEA* (*CaGi*; Cc10_g15270), *LUX-ARRYTHMO* (*CaLUX-ARRYTHMO*; Cc06_g20160), early flowering 3 (*CaELF3*; Cc08_g10110), early flowering 4 (*CaELF4*; Cc04_g01390), Phytochrome interacting factor 4 (*CaPIF4*; Cc05_g00300). In the GPFA 124 hybrid, at dusk, up-regulation of *CaLHY* leads to down-regulation of *CaGI*, *CaLUX*, *CaELF4* leading to up-regulation of *CaPIF4*.

RNAseq analysis of circadian clock genes performed during daytime showed alteration in the GPFA 124 hybrid comparatively to Caturra line. *CaGIGANTEA*, *CaLUX-ARRYTHMO*

and *CaELF4* are negatively correlated with *CaLHY*. *CaLHY* was expressed 0.9 fold lower at ZT0 and 15.27 fold higher at dusk (ZT12) in the hybrid. *CaPRR7* is also repressed in the hybrid at dawn. Therefore, the strong *CaLHY* overexpression in GPFA 124 hybrid at ZT12 is correlated to a down regulation of *CaGIGANTEA*, *CaLUX-ARRYTHMO* and *CaELF4* and an over expression of *CaPIF4* (Fig. 18). Regarding *CaTOC1*, no significant differential expression has been observed whatever the method of analysis used.

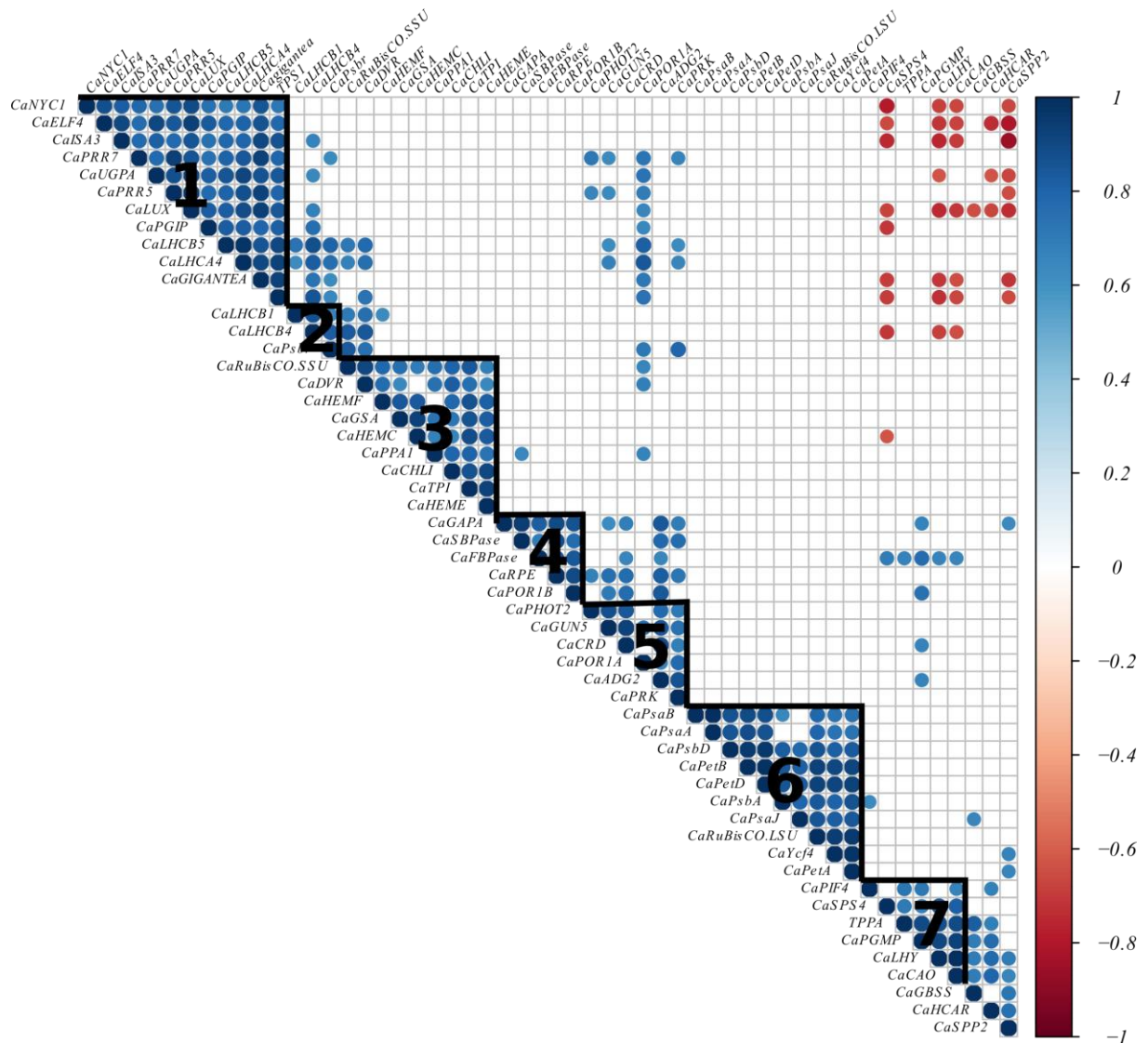


Fig. 19 : Heat map of circadian clock, photosynthesis and chlorophyll metabolism genes correlations. A heat map of correlations for 54 genes involved in circadian clock, photosynthesis and chlorophyll metabolism was created following hierarchical clustering based on the Pearson correlation coefficient. Colors denote Pearson correlation coefficient between genes. Significant positive and negative correlation are in blue and red respectively ($p < 0.001$). We identified 7 clusters annotated from 1 to 7 in the heat map.

In order to understand the vigor of GPFA124 hybrid, we studied particularly the expression of genes involved in circadian clock, chlorophyll biosynthetic and catabolic pathway, photosynthesis and carbon metabolism. We performed a hierarchical clustering

based on Pearson correlation coefficient which revealed 7 clusters of genes (Fig. 19). Some genes involved in circadian clock form cluster of co-expression with genes involved in photosynthesis, chlorophyll and carbon metabolism. For example, the first cluster contained genes involved in circadian clock, genes encoding light-harvesting complex proteins (*CaLHCB5*, *CaLHCA4*), and genes involved in starch and sucrose biosynthesis and *CaNYC* which is involved in chlorophyll cycle. . Cluster 7 included *CaLHY* and *CaPIF4* belonging to circadian clock genes, *CaCAO* implicated in chlorophyll cycle and *CaSPS4*, *CaTPPA* and *CaPGMP* involved in sucrose, trehalose and starch biosynthesis respectively

The second cluster consists of genes encoding for light-harvesting complex and PSII proteins. Cluster 3 contains mainly genes involved in chlorophyll biosynthesis and the nuclear gene encoding small subunit of RuBisCO. Cluster 4 included genes involved in photosynthesis carbon metabolism and *CaPOR1B* implicated in chlorophyll biosynthesis. Cluster 5 is composed of *CaPHOT2* encoding light-harvesting complex protein, genes implicated in chlorophyll biosynthesis and Calvin cycle genes. Cluster 6 contains chloroplast genes of photosynthetic electron transport chain and the chloroplast gene encoding the large subunit of the RuBisCO.

A list of genes under circadian regulation in *Coffea arabica* has been settled using JTK software (Data not published). We performed a fisher exact test to search for enrichment with such genes in differential expressed genes between GPFA 124 hybrid and inbred line Caturra. For each time (ZT0, ZT6 and ZT12), circadian genes were over represented among the genes differentially expressed in the hybrid compared to Caturra with a p-value of 0.0002, 0.004 and $<2.2 \cdot 10^{-16}$ respectively.

3.4.4.4 Metabolic processes begin sooner and are more stable in the hybrid

Enrichment in Gene ontology analysis showed that metabolic processes begin sooner in the hybrid (Table. S2). Indeed, more significant GO terms were found at ZT0 on up-regulated genes in the hybrid. At ZT0 up regulated genes in the inbred line are mainly related to transcription, initiation and RNA metabolic process whereas up regulated genes in the hybrid are mainly related to generation of precursor metabolites and energy, photosynthesis, heterocycle metabolic process and ion transmembrane transport. At ZT6, up regulated genes in the inbred line are mainly related to carbohydrate metabolic process, protein polymerization, cell wall and lipid metabolism process whereas up regulated genes in the

hybrid are mainly related to translation, electron carrier activity, photosynthesis, macromolecule biosynthetic process and homeostasis. At ZT12, genes up regulated in the inbred line are mainly related to translation and cellular biosynthetic process whereas no significant GO term was found within up regulated genes in the hybrid. Enrichment in cell wall metabolic process term occurred only in genes up regulated in the inbred line whereas enrichment in cellular homeostasis term occurred only in genes up regulated in the hybrid.

protoporphyrinogen IX; MgPP IX, Mg-protoporphyrin IX; MgPP-Me; Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester; chl_a, chlorophyll a; chl_b, chlorophyll b; RCC, Red chlorophyll catabolite; PFCC, Fluorescent chlorophyll catabolite; NCC, Nonfluorescent chlorophyll catabolite.

The total chlorophyll content in the hybrid was 32 % higher than in Caturra (Fig. 20A). Chlorophyll b increased slightly more than chlorophyll a. Hybrids accumulated 41 % more chlorophyll b and 30 % more chlorophyll a. The higher chlorophyll content in the GPFA 124 hybrid originated from an increased expression of genes encoding enzymes associated with chlorophyll biosynthesis and a reduced expression of genes encoding enzymes associated with chlorophyll degradation (Fig. 20B). The genes related to chlorophyll biosynthesis are split in two co-expression clusters (Fig. 19): Cluster 3 which contains among all others carbon metabolism related genes and Cluster 5 containing also *CaPHOT2* coding for light-harvesting protein (Fig. 19). Certain genes encoding enzymes involved in chlorophyll biosynthesis (*CaGSA*, *CaHEME*, *CaCHLD*, *CaPOR1A*, *CaCHLG*) were significantly overexpressed in GPFA 124 at ZT0 or/and at ZT6 (Fig. 20B). *CaPOR1A* gene encodes protochlorophyllide oxidoreductases, which mediates the only light-requiring step in chlorophyll biosynthesis in higher plants. *CaPOR1A* expression was 3 fold higher in GPFA 124 hybrid than Caturra at ZT6 (similar result was obtained by qRT-PCR analysis). *CaHCAR* encoding the hydroxymethyl chlorophyll a reductase, an enzyme involved in chlorophyll cycle was 2.3 times over expressed in GPFA 124 hybrid. The expression of *CaPPH* encoding the pheophytinase, an enzyme involved in chlorophyll catabolism was 2.12 times less expressed in GPFA 124 hybrid (Fig. 20B).

3.4.4.6 GPFA 124 hybrid has a better performance index resulting from an increase of photosynthetic electron transport chain efficiency.

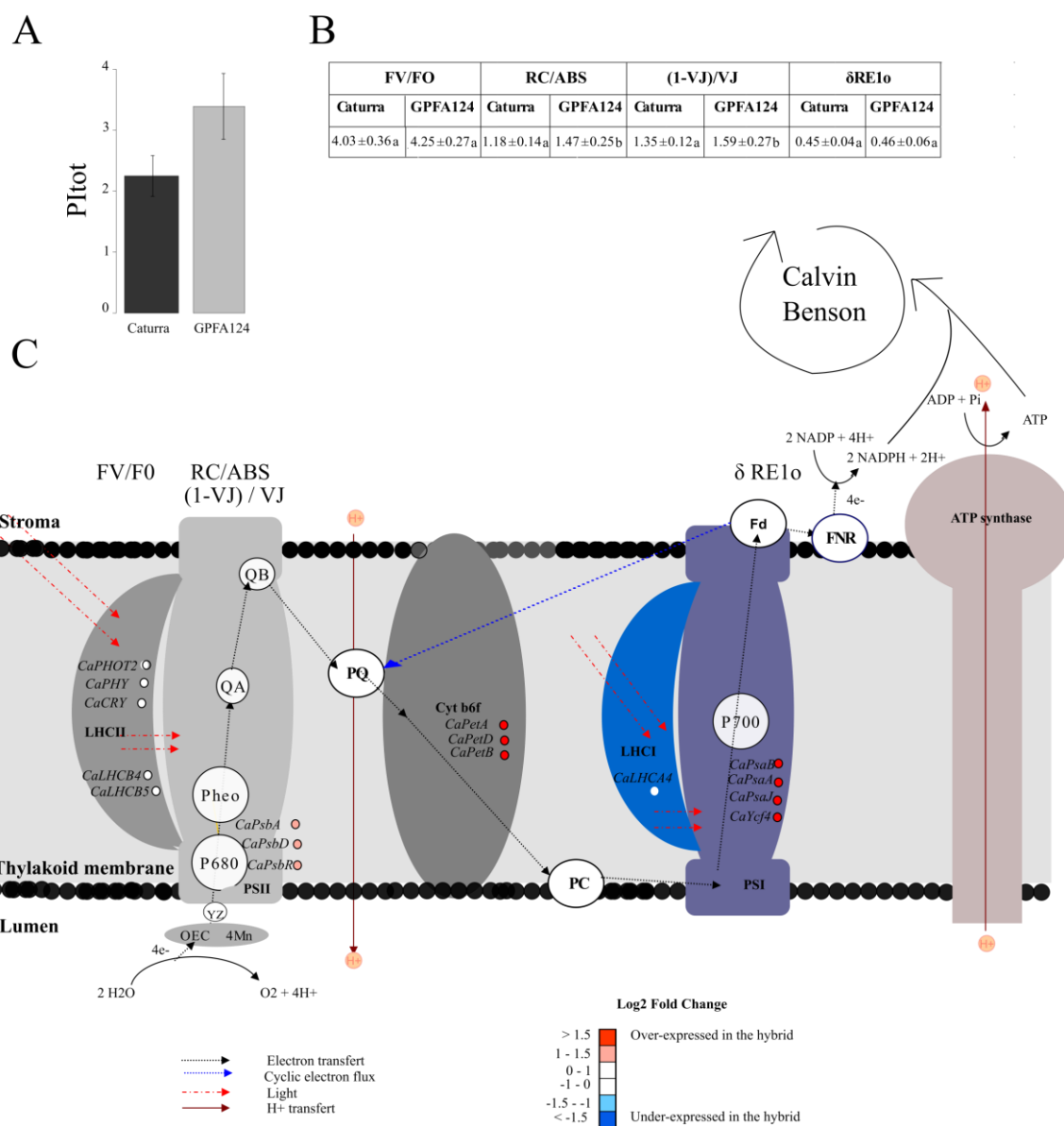


Fig. 21 Study of total performance index in two different *C. arabica* genotypes. A. Total performance index (PI_{tot}) at ZT3. Caturra and GPFA124 are in dark and light gray respectively. B. Table of fluorescence parameters contributing to the total performance index. Data are means ± SD (n=12). Different letters indicate significant differences between the two genotypes according to Mann-Whitney-Wilcoxon's Test (P<0.05). C. Differential expression of electron transfer chain genes at ZT0 in GPFA124 hybrid compared to Caturra. Incoming light is represented by dotted red line. Electron transport pathways are shown by black dotted lines. Blue dotted lines indicate cyclic electron flux. Proton fluxes are indicated by continuous red lines. Linear electron flow (LEF) transport is initiated by the simultaneous absorption of light by two antenna complexes (LHCII and LHCI). The absorbed energy is then transferred to the reaction center chlorophylls P680 and P700. The excited state, P680*, donates an electron to pheophytin, which in turn reduces the primary PQ electron acceptor, QA. QA reduces the secondary PQ electron acceptor, QB. At

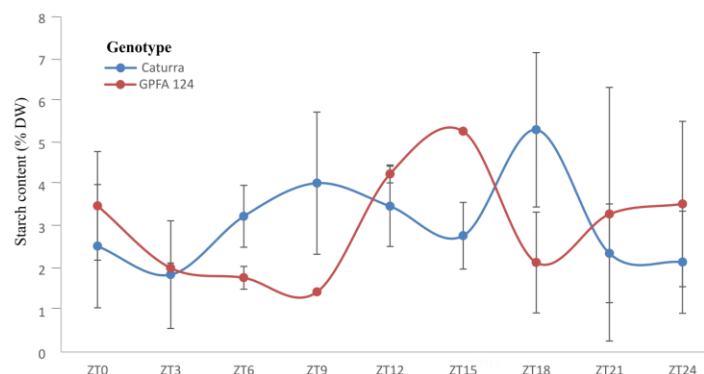
the donor side of PSII, the hole remaining in P680⁺ is filled by a redox-active tyrosine, YZ, which is subsequently reduces OEC. Electrons are then transferred from PSII through the PQ pool to Cytb₆f, which pumps two additional protons across the membrane for each oxidized plastoquinol. Electrons are transported from Cytb₆f to PSI by the soluble electron carrier plastocyanin (PC). PSI acts as light-driven plastocyanin FD oxidoreductase. Ultimately, FNR reduces NADP⁺ to NADPH at the expense of reduced FD. Cyclic electron flow (CEF) proceeds through PSI and Cytb₆f. Electron transport is coupled to proton translocation into the thylakoid lumen, and the resulting pH gradient drives ATP synthase to produce ATP. The reducing power generated via the so-called light reactions, NADPH, as well as the energy available from ATP hydrolysis, are critical for producing sugars from CO₂ through the Calvin–Benson. OEC, Oxygen-evolving complex; YZ, redox-active tyrosine; PSII, photosystem II Pheo, pheophytin; QA, primary electron acceptor quinone molecule; QB, secondary electron acceptor quinone molecule; PQ, plastoquinone; Cytb₆f, cytochrome b₆f; Plastocyanine, PC; LHCI, Light harvesting complex I; PSI, photosystem I; FD, ferredoxin; FNR, ferredoxin–NADP⁺ reductase. The name of the different parameters contributing to PItot (Fv/T0; RC/ABS; (1-VJ)/VJ; δ RE1o) are written above the process they measure. Levels of differential expression at ZT0 between the inbred line Caturra and GPFA 124 hybrid are represented with color dots. Red and blue colors represent significant up and down regulation respectively in GPFA 124 hybrid compared to the inbred line Caturra (corrected Bonferroni p-value < 0.05). The genes represented are Phototropin 2 (*CaPHOT2*; Cc02_g31790), phytochrome (*CaPHY*; Cc02_g36930), cryptochrome (*CaCRY*; Cc10_g07160; Cc03_g05480), light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 4 (*CaLHCB4*; Cc06_g01460), light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 5 (*CaLHCB5*; Cc10_g16210), Photosystem II 10 kDa polypeptide (*CaPsbR*; Cc05_g15930), photosystem II protein D1 (*CaPsbA*, gene1), photosystem II protein D2 (*CaPsbD*, gene28), cytochrome f (*CaPetA*, gene57), cytochrome b₆/f complex subunit IV (*CaPetD*, gene77), cytochrome b₆ (*CaPetB*, gene76), photosystem I P700 apoprotein A1 (*CaPsaA*, gene 36), photosystem I P700 apoprotein A2 (*CaPsaB*, gene35), photosystem I subunit IX (*CaPsaJ*, gene66), photosystem I assembly protein Ycf4 (*CaYcf4*, gene55).

In GPFA124 hybrid, a net increase in efficiency of photosynthesis light dependent reactions (PI_{total}) was observed in comparison to Caturra, by evaluating the total Performance Index for energy conservation from photons absorbed by PSII antenna until the reduction of PSI acceptors (Fig. 21A). Changes in this potential for photochemical utilization of light absorbed in PS II antennae can provide insight into changes in plant photosynthetic performance. It is a multi-parametric expression of four independent steps integrating Fv/F₀, RC/ABS, (1-V_J)/V_J and δ RE1o (Fig. 21B). Fv/F₀ represents the performance due to the trapping probability, RC/ABS represents the contribution of the density of active reaction center (in the sense of quinine acceptor (Q_A) reducing) centers on a chlorophyll basis, (1-V_J)/V_J represents the performance due to the conversion of excitation energy to photosynthetic electron transport, in other words, it is the probability that a trapped electron is transferred and δ RE1o represents the efficiency of the electron transport flux from QB until the PSI end electron acceptors. Clearly, the highest PItotal value found in GPFA124 hybrid is

attributable to an increase in RC/ABS and (1-VJ)/VJ. No significant differences have been observed between Caturra and the hybrid in the energy trapping probability (FV/F0) and in the efficiency of the electron transport flux from QB until the PSI end electron acceptors ($\delta RE1o$) (Fig. 21B). The increase in those latter parameters in the hybrid reflects the up-regulation of PSII reaction centers. Indeed, the expression of genes encoding PSII reaction center core proteins D1 and D2 (*CaPsbA* and *CaPsbD*) was more than 2 times higher in the hybrid than in Caturra. *CaPsbR* associated with the oxygen-evolving complex of photosystem II was also significantly over-expressed (Fig. 21C). Genes encoding light-harvesting complex proteins (*CaPHOT2*, *CaPHY*, *CaCRY*, *CaLHCB1*, *CaLHCB4*, *CaLHCB5*) showed the same level of expression in both genotypes explaining the equivalent trapping efficiency in the hybrid compared to Caturra. However $\delta RE1o$ had similar values in both genotypes even if cytochrome b6f and PSI genes were over-expressed in the hybrid (Fig. 21C). It could be explained by the fact that 1-FI/FM which is assumed to provide insight into the cyclic electron flux was significantly higher in GPFA124 ($P=0.05$, student test). In the case of the PSI cyclic electron transfer, an electron is transferred from Fd to PQ and from there the electrons are transferred back to PSI. Cyclic electron transfer mediates the transfer of protons from stroma to lumen. It can limit photooxidative stress by favoring the ATP to NADPH output ratio.

3.4.4.7 The photosynthetic carbon metabolism is altered in GPFA 124 hybrid

A



B

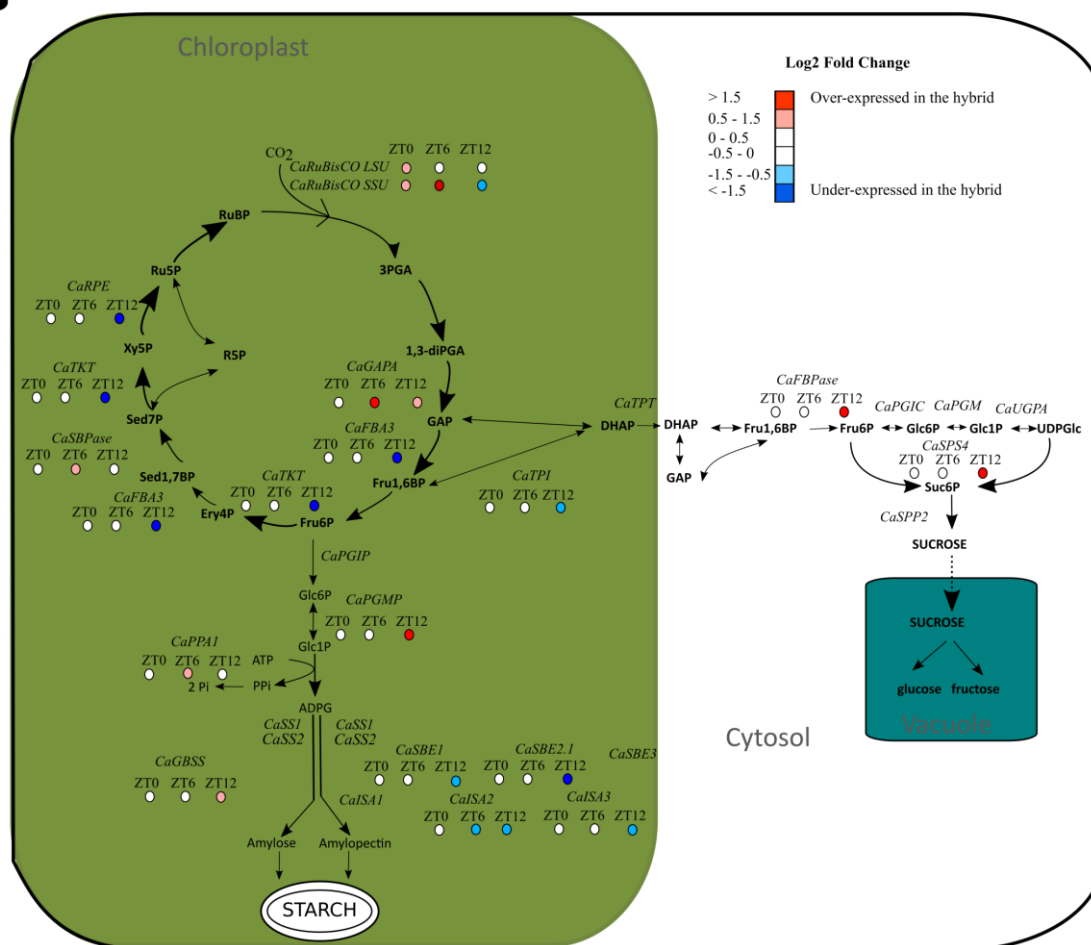


Fig. 22 : Altered photosynthetic carbon metabolism in F1 hybrid. A. Starch circadian cycle. Data are means \pm SD (n=3). Caturra and GPFA124 are in blue and red respectively. **B. Altered expression of genes involved in photosynthesis carbon metabolism at ZT0, ZT6 and ZT12.** Genes found without ambiguity in *Coffea canephora* and *Coffea arabica* genomes were written on the picture. When differences in gene expression between Caturra and GPFA 124 are significant at ZT0, ZT6 or ZT12 (corrected Bonferroni p-value < 0.05), Log2 Fold Change value is indicated by color dot. Red colors, blank and blue color indicate over-expression, equivalent expression and under-expression in GPFA 124 hybrid compared to Caturra. Genes encode the following enzymes: RubiscCO (*CaRuBisCO LSU*; gene52, *CaRuBisCO SSU*; Cc00_g15710), NADP-glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

(*CaGAPA*; Cc11_g00610), plastidic triose phosphate isomerase (*CaTPI* ; Cc02_g16530), plastidic aldolase (*CaFBA3*; Cc11_g09330), transketolase (*CaTKT*; Cc02_g11220), sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (*CaSBPase*; Cc02_g06960), ribulose phosphate epimerase (*CaRPE*; Cc04_g15130, triose phosphate translocator (*CaTPT*; Cc02_g13860), cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase (*CaFBPase*; Cc10_g14740), cytosolic phosphoglucoisomerase (*CaPGIC*; Cc10_g02960), cytosolic phosphoglucomutase (*CaPGM*; Cc11_g08200), UDP-glucose pyrophosphorylase (*CaUGPA*; Cc07_g12830), sucrose phosphate synthase (*CaSPS4*; Cc10_g16060), sucrose-6 ϕ -phosphate phosphatase (*CaSPP2*; Cc06_g06940), plastidic phosphoglucoisomerase (*CaPGIP*; Cc10_g15670), plastidic phosphoglucomutase (*CaPGMP*; Cc02_g03610), inorganic pyrophosphatase (*CaPPAI*; Cc02_g20460), soluble starch synthase (*CaSSI*; Cc02_g01480, *CaSS2*; Cc07_g03430), granule-bound starch synthase (*CaGBSS*; Cc08_g16970), starch branching enzyme (*CaSBE1*; Cc10_g00640, *CaSBE2.1* ; Cc06_g05400, *CaSBE3*; Cc05_g14070), isoamylase (*CaISA1*; Cc10_g11550, *CaISA2*; Cc08_g00630, *CaISA3*; Cc10_g06640)

For simplicity, only the main pathway of carbon is shown, and the use of dihydroxyacetone (DHAP) as a substrate in the two transketolase reactions, and of glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) as a substrate in the second aldolase reaction leading to the formation of sedoheptulose-1,7-bisphosphate (Sed1,7BP) have been omitted.

Starch content followed a circadian rhythm for both genotypes and showed one peak during the night at ZT15 for GPFA124 and two peaks at ZT9 and ZT15 for Caturra (Fig. 22A). Even if the transitory starch content accumulation over 24 hours was similar for both genotypes (27.7 % and 27.2 % for Caturra and GPFA124 respectively), the circadian rhythm was different. The peak of starch for GPFA124 hybrid occurred between those of Caturra. At ZT0, the content in starch of the hybrid is 1.5 times higher. Between ZT3 to ZT9, when photosynthesis is the most important, Caturra produced and accumulated starch while the hybrid consumed its reserves. The maximal leave content in starch is similar for both genotypes (5% DW), but the timing is different. The maximum is reached respectively at ZT15 and ZT18 for the hybrid and Caturra.

An over-expression of genes encoding RuBbisCO large and small subunits was observed in the hybrid at the beginning of the day (Fig. 22B). Genes involved in the CO₂ acceptor RuBP was under-expressed in the hybrid at the end of the day whereas sucrose and starch biosynthesis pathway are enhanced. *CaGAPA* and *CaSBPase* are highly correlated ($r^2=0.94$, $p\text{-value}=2.42\text{E-}08$). Indeed, Glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) produced by GAPA is used as a substrate in the second aldolase reaction leading to the formation of sedoheptulose-1,7-bisphosphate (sed 1,7 BP) which is SBPase substrate. It could explain the overexpression of *CaSBPase* at ZT12. For clarity, this pathway has not been drawn on the Figure. At dusk, genes involved in amylopectin biosynthesis (*CaSBE1*, *CaSBE2* *CaISA2* and *CaISA3*) are under-expressed in the GPFA124 hybrid.

3.4.5 Discussion

Recent studies on *Arabidopsis* hybrids (Ni *et al.* 2009), rice hybrids (Shen *et al.*, 2015) and maize hybrids (Ko *et al.*, 2016), clearly demonstrated an increased photosynthetic and metabolic activities linked to altered expression of circadian clock regulators. As well as acting within the clock mechanism, many genes of the circadian core clock regulate sets of other genes (30-40% of *Arabidopsis* genes) that contribute to a wide range of phenotypic traits (Harmer, 2009; Nagel and Kay, 2012). Considering GPFA124, vigorous Arabica genotype F1 hybrid, in field or in controlled conditions; it showed higher growth and a better resistance to multi-stresses conditions than the pure-line variety (Toniutti *et al.* 2017). An equivalent observation has been made recently by Echeverria-Beirute (2017) in another F1 hybrid. To investigate if a similar relationship between growth vigor and circadian clock exists in coffee, we first compared daily expression of core clock regulators in coffee and *Arabidopsis* and demonstrated a similar expression pattern. The only major difference is related to the absence of one Myb-related gene. In *Arabidopsis*, two MYB-related genes are present in the core of the oscillator of the circadian clock, *LHY* and *CCA1*, but only the orthologous gene *CaLHY* is present in *C. canephora* and *C. arabica* genomes. This is also the case for *Oryza sativa* (Izawa, Takahashi and Yano, 2003). Because of the high level of conservation of circadian clock signaling among plants, it is therefore very likely that functioning of the core clock gene is highly similar in *Arabidopsis* and Coffee trees. During daytime, *LHY* forms a negative-feedback loop with genes of the Evening Complex (*ELF4*, *ELF3* and *LUX-ARRYTHMO*) (Shim *et al.* 2014). Moreover, *LHY* negatively regulated *GIGANTEA* (Huang *et al.* 2016). It was consistent with our results showing that *CaELF4*, *CaLUX-ARRYTHMO* and *CaGIGANTEA* are in the same cluster of co-expression and negatively correlated with *CaLHY* expression. As demonstrated in *Arabidopsis* (Ni *et al.* 2009; Miller *et al.* 2012), we found that *CaLHY* is repressed at dawn and up-regulated at dusk in coffee hybrid comparatively to Caturra line. Because *LHY* serves as both a transcriptional repressor and activator of target genes, including those in the core circadian oscillator and output pathways, we postulated a similar role of *LHY* deregulation in coffee growth vigor as observed in *Arabidopsis*. The first link between GPFA 124 hybrid vigor and deregulation of the circadian clock could be explained by the down regulation of the evening complex genes. The up-regulation of *CaLHY* at dusk led to a down regulation of *CaELF4* and *CaLUX-*

ARRYTHMO leading to an up-regulation of *CaPIF4*. The circadian regulation of *PIF4* expression depends on early evening repression by the evening complex. Because *PIF4* is coding for a constitutive transcriptional activator promoting hypocotyl growth by targeting gibberellic acids, ethylene, cytokinins and auxin-associated genes (Nomoto *et al.* 2012; Leivar & Monte 2014; Seaton *et al.* 2015), the up-regulation of *CaPIF4* in the GPFA 124 hybrid at dusk could explain higher growth. Moreover, GPFA 124 showed higher yield. It has been demonstrated that circadian clock controls key agricultural traits in crop plants. By comparing cultivated and wild tomatoes, Müller *et al.* (2015) showed that humans selected slower circadian rhythms to adapt the cultivated species to the long summer days occurring in Europe and thus enhance the crop performance. Alterations of the circadian oscillator have also the potential to increase agricultural yield (Dodd *et al.* 2014). Preuss *et al.* (2012) observed on Soybean an increase of seed weight, number of flowers, pods and nodes by manipulating the abundance of transcripts encoding Soybean LHY and TOC1.

CaLHY is an activator for morning-phased central clock genes (*PRR7* and *PRR9*) and photosynthetic genes, including CAB genes. Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics revealed that *PRR9*, 7, and 5 and *LHY* negatively regulate the biosynthetic pathways of chlorophyll highlighting them as additional outputs of pseudo-response regulators (Fukushima *et al.* 2009; Hsu & Harmer 2014). *LHY* also negatively regulates downstream genes containing the evening element (EE) or the CCA1 binding site (CBS) in their promoter (Ni *et al.* 2009; Miller *et al.* 2012). We found CBS and Evening elements sequences in promoters of main genes involved in chlorophyll biosynthesis and photosynthesis. In coffee hybrid, *CaPPR7* and *CaLHY* were found down-regulated at dawn and the chlorophyll content was 32% higher at noon. Half of the CAB genes identified in coffee genome present an altered expression in the hybrid. Comparative expression analysis of genes involved in chlorophyll metabolism demonstrated that genes involved in chlorophyll biosynthesis are up-regulated and genes encoding enzymes associated with chlorophyll degradation are down-regulated in the hybrid. Most of the chlorophyll biosynthesis genes, like *CaPOR1A*, *CaHEME* and *CaCHLD* contain evening element and CBS and are potentially under the control of *CaLHY*. Therefore *CaCAO* involved in chlorophyll cycle was highly correlated with *CaLHY* ($r=0.99$). Down regulation of *CaLHY* at dawn can explain the higher chlorophyll content. In the same way, down regulation of *CaPPR7*, a negative regulator of biosynthetic pathways of chlorophyll, can strengthen this mechanism (Fukushima *et al.* 2009). Because higher chlorophyll content is not a direct proof of a better photosynthetic efficiency, we compared efficiency of photosynthesis light dependent reactions by measuring chlorophyll

fluorescence in the hybrid and Caturra. Chlorophyll *a* fluorescence is a very sensitive probe of physiological status of leaves and plant performance in a wide range of situations (Baker and Rosenqvist, 2004). Combination of chlorophyll fluorescence measurement and global transcriptional activity in leave cells provides a powerful method to analyze photosynthesis efficiency. In GPFA124 hybrid, the net increase in efficiency of photosynthesis light dependent reactions was due, in part, to higher density of active reaction center (correlated with higher chlorophyll content), and to a better conversion of excitation energy to photosynthetic electron transport. The increase in those parameters in the hybrid reflects the up-regulation of PSII reaction centers. In a coherent way, the genes involved in these mechanisms are over-expressed in the hybrid. The over-expression of PSI genes combined with an increased. Handy PEA 1-FI/FM indicator shows an increase cyclic electron transfer and a better ATP and NADPH output ratio. The measure of chlorophyll fluorescence showed the superiority of the hybrid in term of performance index and efficiency of electron transport chain and-probably the lower ROS production in the hybrid.

Growth in plants is regulated by environmental factors, as well as by carbon availability, developmental stage and the circadian clock. The interaction between these factors determines the phase of maximal growth rate in different plant organs (Farré, 2012). In our experiment, environmental factors, carbon availability and developmental stage are similar for both GPFA124 hybrid and Caturra inbred line, but we demonstrated an alteration in GPFA124 hybrid circadian clock. An accurate control of carbon partitioning, starch degradation, and sucrose export rates is crucial to avoid carbon starvation, insuring optimal growth whatever the photoperiod (Feugier and Satake, 2013). In photosynthetic cells, starch is synthesized mostly using a fraction of the CO₂-fixed carbon and temporally stored in the chloroplasts. This starch is called ‘transitory’ as it is synthesized and degraded within a 24-h window (Thalmann and Santelia, 2017). The adjustment in the rate of starch degradation during night is dictated by the anticipation of dawn, as determined by the circadian clock (Greenham and McClung, 2015). Control of the supply of carbohydrate for growth during the night is a major and previously overlooked function of circadian mechanisms in plants (Graf *et al.*, 2010). Because *GIGANTEA* is required for sucrose sensing by the plant circadian clock (Dalchau *et al.* 2011), and *PRR7* regulates chlorophyll biosynthesis and acts as a transcriptional repressor in circadian sugar signaling (Haydon *et al.* 2013), the down-regulation of these genes can explain, at least partially, the difference in starch circadian cycle in the hybrid GPFA 124. At dawn, the level of starch is 1.5 higher in the hybrid leaves. Moreover, genes coding for Rubisco sub-units were over-expressed in the hybrid at dawn leading to a better CO₂

assimilation. Indeed, large Rubisco subunit gene belongs to the cluster of co-expression of chloroplast genes. At dusk, we observed an enhanced carbon reduction in sucrose and starch and a reduced CO₂ acceptor regeneration in the hybrid. It suggested that the GPFA124 hybrid has already accumulated all reserves whereas the inbred line Caturra still needed to assimilate carbon through Calvin cycle. Gene ontology enrichment analysis showed that metabolic process occurred later in the inbred line as if the hybrid wakes up early to promote photosynthesis and biomass accumulation (Table. S2). At dusk, starch biosynthesis pathway is enhanced in favor of amylose biosynthesis whereas genes involved in amylopectin biosynthesis are under-expressed in the GPFA124 hybrid. Amylopectin accounts for 80 % of starch. The under-expression at ZT12 of *CaSBE1*, *CaSBE2*, *CaISA2* and *CaISA3* could explain that the starch content peak occurred sooner in the hybrid. The rate of starch degradation is tightly regulated such that energy stores are not depleted before photosynthesis can resume (Greenham and McClung, 2015). Starch accumulation is a mechanism which prevents down-regulation of photosynthesis by providing an outlet for photosynthetic end-products when exports fail to evacuate them effectively. Consequently, starch accumulation can be considered as an indicator of poor sugar-export efficiency (Campa *et al.* 2017). In Caturra, the continuous increase in starch content between ZT3 to ZT9 indicated low sugar-export efficiency. Because the hybrid consumes starch in the same time, combined with a more efficient photosynthesis, sugar-export efficiency and sugar available for metabolism must be considerably higher compared to the line. In photosynthetic sucrose synthesis, CFBPase catalyzes the first irreversible reaction from fructose-1,6-biphosphate to fructose-6-phosphate and plays important regulatory role in sucrose biosynthesis. Cho *et al.* (2012) showed by generating transgenic Arabidopsis plants which overexpressed both TPT and FBPase, that their simultaneous overexpression leads to enhanced growth and increased CO₂ assimilation rates. In our data, both genes were overexpressed in the GPFA124 hybrid at ZT12 even if *CaTPT* overexpression was not significant at 0.05 thresholds (Fig. 22). Moreover, sucrose-phosphate synthase SPS4 was overexpressed in the hybrid at ZT12 suggesting an increase photosynthetic capacity. The expression of a SPS gene from maize resulted in increased photosynthetic rates in transgenic tomato plants under light and CO₂ saturated conditions (Galtier *et al.* 1993).

The link between the circadian cycle and the growth vigor seems to be a constant to plants. Finally, our transcriptomic approach allowed to go farther on the understanding of molecular mechanisms and confirmed that the growth vigor is closely related to a better photosynthesis performance and carbon partitioning. Together, these data offer new insights

into a better understanding of the complexity of growth vigor in an intraspecific hybrid and are of direct relevance to coffee crop production and for further breeding program aiming to produce coffee varieties with a lower rust incidence.

3.4.6 Supporting information

Table S1 Correlation between QRT-PCR and RNAseq data

Gene	Genotype	Circadianl time	RNAseq data	QPCR-data
LHY Cc02_g39990	Caturra	ZT6	256,5476104	0,1626677
		ZT12	50,18151487	0,0463914
		ZT0	5612,537204	1,6586391
	GPFA124	ZT6	359,4155783	0,0877778
		ZT12	10080,8057	3,2490096
		ZT0	4119,316204	0,54
Gigantea Cc10_g15270	Caturra	ZT6	6163,158835	1,4339552
		ZT12	2847,810746	1,1809927
		ZT0	187,2262043	0,07
	GPFA124	ZT6	7644,051505	1,7532114
		ZT12	385,9373607	0,1894646
		ZT0	120,8711068	0,075363
POR1A Cc05_g12370	Caturra	ZT6	1850,554204	1,14
		ZT12	1180,047862	0,84
		ZT0	1014,312685	0,61
	GPFA124	ZT6	5230,710095	2,6944672
		ZT12	1574,462391	1,3566043
		ZT0	1105,266275	0,6506709
POR1B Cc05_g06850	Caturra	ZT6	1843,324159	0,4352753
		ZT12	1244,407347	0,5212329
		ZT0	2287,523108	0,7022224
	GPFA124	ZT6	2856,984178	1,057018
		ZT12	3266,506558	2,8088898
		ZT0	2431,289887	1,1407637
GWD1 Cc11_g15490	Caturra	ZT6	5830,627706	0,952638
		ZT12	4898,725728	1,1172871
		ZT0	1751,301127	0,4537596
	GPFA124	ZT6	6293,91665	2,5315132
		ZT12	2994,390814	1,0069556
		ZT0	3215,304702	1,3013419
Person's correlation			0,795656174	

1

Table S2 Gene ontology enrichment analysis performed on AGRIGO V2 based on multiple hypothesis tests (FDRs). The colored blocks in the heatmap represent the level of significiance in each GO term at ZT0, ZT6 and ZT12.

Subset of underexpressed genes in the hybrid				Subset of overexpressed genes in the hybrid					
GO Term	Description	ZT0	ZT6	ZT12	GO Term	Description	ZT0	ZT6	ZT12
GO:0006352	transcription initiation				GO:0055085	transmembrane transport			
GO:0016070	RNA metabolic process				GO:0009206	purine ribonucleoside triphosphate biosynthetic process			
GO:0006629	lipid metabolic process				GO:0055114	oxidation reduction			
GO:0005975	carbohydrate metabolic process				GO:0046483	heterocycle metabolic process			
GO:0044264	cellular polysaccharide metabolic process				GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process			
GO:0007017	microtubule-based process				GO:0009142	nucleoside triphosphate biosynthetic process			
GO:0007264	small GTPase mediated signal transduction				GO:0009145	purine nucleoside triphosphate biosynthetic process			
GO:0023046	signaling process				GO:0015979	photosynthesis			
GO:0051258	protein polymerization				GO:0006119	oxidative phosphorylation			
GO:0016758	transferase activity, transferring hexosyl groups				GO:0015985	energy coupled proton transport, down electrochemical gradient			
GO:0005507	copper ion binding				GO:0015986	ATP synthesis coupled proton transport			
GO:0070001	aspartic-type peptidase activity				GO:0006091	generation of precursor metabolites and energy			
GO:0008471	laccase activity				GO:0034220	ion transmembrane transport			
GO:0005618	cell wall				GO:0009579	thylakoid			
GO:0015630	microtubule cytoskeleton				GO:0034357	photosynthetic membrane			
GO:0006412	translation				GO:0006412	translation			
GO:0044249	cellular biosynthetic process	GO:0045454	cell redox homeostasis						
GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process	GO:0019725	cellular homeostasis						
GO:0006457	protein folding	GO:0042592	homeostatic process						
GO:0003735	structural constituent of ribosome	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic process						
GO:0005739	mitochondrion	GO:0003735	structural constituent of ribosome						
FDR				GO:0009055	electron carrier activity				
		GO:0009055	electron carrier activity						
		GO:0016491	oxidoreductase activity						
		GO:0005840	ribosome						
		GO:0009523	photosystem II						
		GO:0009654	oxygen evolving complex						

2

Table S3: Genes involved in circadian clock. GPFA 124 hybrid was compared to Caturra at three times (ZT0, ZT6, ZT12). The color code represents significant up-regulation (red) and down-regulation (blue). For example, at ZT0, we observed a down regulation of the hybrid for CaPRR7

Locus ID	Name	Canephora annotation	Arabica annotation	E	ZT0					ZT6					ZT12				
					log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
Cc02_g00820	CaPRR5	Putative Two-component response regulator-like APRR5~ APRR5	evm.model.Scaffold_637.1359 (1 of 2) K12130 - pseudo-response regulator 5 (PRR5)	0	-1,482	0,755	-1,961	0,050	0,294	0,391	0,256	1,527	0,127	0,327	0,168	0,551	0,306	0,760	0,847
Cc02_g39990	CaLHY	Putative Protein LHY~ LHY	evm.model.Scaffold_637.1550 (1 of 2) K12130 - pseudo-response regulator 5 (PRR5)	0															
			evm.model.Scaffold_2039.492 (1 of 1) K12133 - MYB-related transcription factor LHY (LHY)	0	-0,449	0,302	-1,487	0,137	0,476	0,475	0,258	1,845	0,065	0,210	-7,636	0,421	18,155	0,000	0,000
			evm.model.Scaffold_352.168 (1 of 3) PTHR33469:SF3 - PROTEIN ELF4-LIKE 2-RELATED	2.3E-78	-0,075	0,447	-0,167	0,867	0,964	-0,470	0,214	-2,191	0,028	0,120	-2,400	0,482	-4,978	0,000	0,000
Cc04_g01390	CaELF4	Protein ELF4-LIKE 4~ EFL4	evm.model.Scaffold_626.47 (1 of 2) K12127 - pseudo-response regulator 1 (TOC1, APRR1)	0	-0,437	0,289	-1,513	0,130	0,467	-0,024	0,263	-0,091	0,927	0,968	0,096	0,392	0,245	0,806	0,880
Cc05_g00300	CaPIF4	Putative Transcription factor PIF4~ PIF4	evm.model.Scaffold_411.53 (1 of 2) K12127 - pseudo-response regulator 1 (TOC1, APRR1)	0															
			evm.model.Scaffold_412.12 (1 of 2) K16189 - phytochrome-interacting factor 4 (PIF4)	0	-1,109	0,604	-1,835	0,066	0,340	-0,248	0,276	-0,899	0,368	0,621	1,111	0,385	2,886	0,004	0,015
			evm.model.Scaffold_333.42 (1 of 2) K16189 - phytochrome-interacting factor 4 (PIF4)	0															
Cc06_g03460	CaPRR7	Putative Two-component response regulator-like APRR7~ APRR7	evm.model.Scaffold_558.134 (1 of 3) K12129 - pseudo-response regulator 7 (PRR7)	0	-2,347	0,648	-3,620	0,000	0,014	0,374	0,192	1,946	0,052	0,179	0,474	0,447	1,060	0,289	0,433
			evm.model.Scaffold_571.392 (1 of 3) K12129 - pseudo-response regulator 7 (PRR7)	0															
			evm.model.Scaffold_216.501 (1 of 284) PF00249 - Myb-like DNA-binding domain (Myb_DNA-binding)	4.7E-156	0,241	0,381	0,631	0,528	0,825	0,084	0,189	0,445	0,656	0,833	-1,202	0,252	-4,772	0,000	0,000
Cc08_g01010	CaELF3	Putative Protein EARLY FLOWERING 3~ ELF3	evm.model.Scaffold_465.247 (1 of 2) K12125 - protein EARLY FLOWERING 3 (ELF3)	0	-0,144	0,341	-0,421	0,674	0,891	-0,097	0,218	-0,444	0,657	0,834	-0,247	0,407	-0,607	0,544	0,679
Cc10_g15270	CaGIGANTEA	Protein GIGANTEA~ GI	evm.model.Scaffold_597.214 (1 of 2) K12125 - protein EARLY FLOWERING 3 (ELF3)	0															
			evm.model.Scaffold_628.161 (1 of 1) K12124 - GIGANTEA (GI)	0	-0,636	0,800	-0,795	0,427	0,766	0,301	0,207	1,451	0,147	0,360	-2,881	0,451	-6,385	0,000	0,000

Table S4: Genes involved in chlorophyll biosynthetic and catabolic pathways. GPFA 124 hybrid was compared to Caturra at ZT0 and ZT6. The color code represents significant up-regulation (red) and down-regulation (blue). For example, we observed an up regulation of the hybrid for CHLD

Locus ID	Name	Canephora annotation	Arabica annotation	E	T0					T6				
					log2Fol	lfcSE	stat	pvalue	padj	log2Fol	lfcSE	stat	pvalue	padj
Cc10_g12640	CaGSA	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase, chloroplastic~ GSA	evm.model.Scaffold_1841.131 (1 of 2) 5.4.3.8 - Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase / Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	0	1,294	0,285	4,548	0,000	0,001	0,941	0,292	3,225	0,001	0,011
			evm.model.Scaffold_628.551 (1 of 2) 5.4.3.8 - Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase / Glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	0										
Cc05_g16090	CaHEMC	Porphobilinogen deaminase, chloroplastic~ HEMC	evm.model.Scaffold_770.1124 (1 of 2) 2.5.1.61 - Hydroxymethylbilane synthase / Uroporphyrinogen synthetase	0	0,697	0,439	1,587	0,113	0,438	0,694	0,317	2,188	0,029	0,120
			evm.model.Scaffold_770.1124 (1 of 2) 2.5.1.61 - Hydroxymethylbilane synthase / Uroporphyrinogen synthetase	0										
Cc05_g11120	CaHEME	Uroporphyrinogen decarboxylase 1, chloroplastic~ At3g14930	evm.model.Scaffold_770.1660 (1 of 3) K01599 - uroporphyrinogen decarboxylase (hemE, UROD)	0	1,125	0,422	2,666	0,008	0,103	0,958	0,322	2,976	0,003	0,021
			evm.model.Scaffold_770.451 (1 of 3) K01599 - uroporphyrinogen decarboxylase (hemE, UROD)	0										
Cc09_g04450	CaHEMF	Coproporphyrinogen-III oxidase, chloroplastic~ CPX	evm.model.Scaffold_539.220 (1 of 2) 1.3.3.3 - Coproporphyrinogen oxidase / Coproporphyrinogenase	0	0,697	0,417	1,674	0,094	0,404	0,639	0,480	1,331	0,183	0,414
			evm.model.Scaffold_539.220 (1 of 2) 1.3.3.3 - Coproporphyrinogen oxidase / Coproporphyrinogenase	0										
Cc06_g17100	CaGUNS	Putative Magnesium-chelatase subunit H~ bchH	evm.model.Scaffold_216.39 (1 of 1) K03403 - magnesium chelatase subunit H (chlH, bchH)	0	0,114	0,411	0,278	0,781	0,931	0,794	1,029	0,771	0,441	0,682
			evm.model.Scaffold_913.27 (1 of 1) K03404 - magnesium chelatase subunit D (chlD, bchD)	0	0,589	0,325	1,815	0,070	0,348	1,219	0,465	2,620	0,009	0,050
Cc07_g18500	CaCHLJ	Magnesium-chelatase subunit chlI, chloroplastic~ CHLJ	evm.model.Scaffold_605.46 (1 of 2) K03405 - magnesium chelatase subunit I (chlI, bchl)	0	0,874	0,353	2,475	0,013	0,141	0,959	0,406	2,364	0,018	0,085
			evm.model.Scaffold_564.24 (1 of 2) K03405 - magnesium chelatase subunit I (chlI, bchl)	0										
Cc06_g22740	CaCRD	Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester [oxidative] cyclase, chloroplastic~ CRC	evm.model.Scaffold_494.11 (1 of 2) K04035 - magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase (E1.14.13.81, acsF, chlE)	0	-0,045	0,338	-0,133	0,894	0,972	0,614	0,566	1,085	0,278	0,531
			evm.model.Scaffold_493.10 (1 of 2) K04035 - magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase (E1.14.13.81, acsF, chlE)	0										
Cc05_g12370	CaPOR1A	Protochlorophyllide reductase, chloroplastic~ POR1	evm.model.Scaffold_770.1537 (1 of 4) 1.3.1.33 - Protochlorophyllide reductase / Protochlorophyllide oxidoreductase	0	0,120	0,463	0,259	0,796	0,938	1,493	0,631	2,367	0,018	0,085
			evm.model.Scaffold_770.586 (1 of 4) 1.3.1.33 - Protochlorophyllide reductase / Protochlorophyllide oxidoreductase	0										
Cc05_g06850	CaPOR1E	Protochlorophyllide reductase, chloroplastic~ POR1	evm.model.Scaffold_609.252 (1 of 2) 1.3.1.33/1.6.99.1 - Protochlorophyllide reductase / Protochlorophyllide oxidoreductase // NADPH dehydrogenase / NADPH diap	0	0,084	0,286	0,292	0,770	0,927	0,624	0,403	1,547	0,122	0,318
			evm.model.Scaffold_745.440 (1 of 2) 1.3.1.33/1.6.99.1 - Protochlorophyllide reductase / Protochlorophyllide oxidoreductase // NADPH dehydrogenase / NADPH diap	0										
Cc03_g02320	CaDVR	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein~ unknown_gene	evm.model.Scaffold_315.271 (1 of 2) K19073 - divinyl chlorophyllide a 8-vinyl-reductase (DVR)	0	0,646	0,318	2,034	0,042	0,270	1,084	0,690	1,570	0,116	0,309
			evm.model.Scaffold_624.834 (1 of 2) K19073 - divinyl chlorophyllide a 8-vinyl-reductase (DVR)	0										
Cc06_g01120	CaCHLG	Chlorophyll synthase, chloroplastic~ CHLG	evm.model.Scaffold_571.136 (1 of 2) K04040 - chlorophyll synthase (chlG, bchG)	0	1,319	0,300	4,394	0,000	0,001	0,395	0,385	1,028	0,304	0,560
			evm.model.Scaffold_439.366 (1 of 2) K04040 - chlorophyll synthase (chlG, bchG)	0										
Cc10_g11980	CaCAO	Chlorophyllide a oxygenase, chloroplastic~ CAO	evm.model.Scaffold_506.69 (1 of 2) 1.14.13.122 - Chlorophyllide-a oxygenase / Chlorophyll-b synthase	0	-0,769	0,390	-1,973	0,049	0,291	-0,048	0,480	-0,100	0,920	0,965
			evm.model.Scaffold_628.652 (1 of 2) 1.14.13.122 - Chlorophyllide-a oxygenase / Chlorophyll-b synthase	0										
Cc06_g09730	CaNYC1	Probable chlorophyll(ide) b reductase NYC1, chloroplastic~ NYC1	evm.model.Scaffold_63.6 (1 of 4) K13606 - chlorophyll(ide) b reductase (NOL, NYC1)	0	0,759	0,332	2,287	0,022	0,191	-0,068	0,252	-0,269	0,788	0,904
			evm.model.Scaffold_671.925 (1 of 4) K13606 - chlorophyll(ide) b reductase (NOL, NYC1)	0										
			evm.model.Scaffold_576.272 (1 of 4) K13606 - chlorophyll(ide) b reductase (NOL, NYC1)	0										
Cc03_g07000	CaHCAR	7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase, chloroplastic~ HCAR	evm.model.Scaffold_624.243 (1 of 1) K18010 - 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase (HCAR)	0	-0,078	0,450	-0,173	0,863	0,962	1,137	0,394	2,888	0,004	0,027
			evm.model.Scaffold_627.152 (1 of 2) PTHR10992:SF879 - PHEOPHYTINASE, CHLOROPLASTIC	0	0,511	0,284	1,798	0,072	0,354	-1,065	0,415	-2,564	0,010	0,057
Cc01_g10220	CaPAO	Pheophorbide a oxygenase, chloroplastic~ PAO	evm.model.Scaffold_591.66 (1 of 2) PTHR10992:SF879 - PHEOPHYTINASE, CHLOROPLASTIC	0										
			evm.model.Scaffold_2016.1281 (1 of 2) K13071 - pheophorbide a oxygenase (PAO, ACD1)	0	0,423	0,313	1,353	0,176	0,536	-0,358	0,441	-0,812	0,417	0,662
			evm.model.Scaffold_601.592 (1 of 2) K13071 - pheophorbide a oxygenase (PAO, ACD1)	0										
Cc03_g11370	CaRCCR	Red chlorophyll catabolite reductase, chloroplastic~ RCCR	evm.model.Scaffold_335.36 (1 of 1) K13545 - red chlorophyll catabolite reductase (ACD2)	0	0,405	0,410	0,987	0,324	0,688	-0,479	0,227	-2,113	0,035	0,137

Table S5: Genes involved in light-dependent reactions of photosynthesis. GPFA 124 hybrid was compared to Caturra at ZT0. The color code represents significant up-regulation (red) and down-regulation (blue). For example, we observed an up regulation of the hybrid for Psbr

Locus ID	Name	Canephora annotation	Arabica annotation	E	log2Fo	lfcSE	stat	pvalue	padj
			scaffold id						
Cc02_g31790	CaPHOT2	Phototropin-2~ PHOT2	evm.model.Scaffold_1982.55 (1 of 2) PTHR24351:SF81 - PHOTOTROPIN-2	0	0,26	0,24	1,11	0,27	0,64
			evm.model.Scaffold_2682.70 (1 of 2) PTHR24351:SF81 - PHOTOTROPIN-2	0					
Cc02_g36930	CaPHY	Phytochrome A1~ PHYA1	evm.model.Scaffold_2039.77 (1 of 2) PTHR24423:SF519 - PHYTOCHROME A	0	-0,02	0,34	-0,06	0,95	0,99
			evm.model.Scaffold_636.294 (1 of 2) PTHR24423:SF519 - PHYTOCHROME A	0					
			evm.model.Scaffold_1056.1 (1 of 2) PTHR24423:SF493 - PHYTOCHROME C	0					
			evm.model.Scaffold_598.9 (1 of 2) PTHR24423:SF493 - PHYTOCHROME C	0					
			evm.model.Scaffold_624.1019 (1 of 2) K12121 - phytochrome B (PHYB)	0					
			evm.model.Scaffold_315.81 (1 of 2) K12121 - phytochrome B (PHYB)	0					
Cc10_g07160	CaCRY	Cryptochrome-1~ CRY1	evm.model.Scaffold_214.241 (1 of 2) K12118 - cryptochrome 1 (CRY1)	0	-0,15	0,44	-0,35	0,73	0,91
			evm.model.Scaffold_522.405 (1 of 2) K12118 - cryptochrome 1 (CRY1)	0					
			evm.model.Scaffold_624.443 (1 of 2) K12119 - cryptochrome 2 (CRY2)	0					
			evm.model.Scaffold_315.646 (1 of 2) K12119 - cryptochrome 2 (CRY2)	0					
Cc03_g05480	CaCRY	Cryptochrome-2~ CRY2	evm.model.Scaffold_624.443 (1 of 2) K12119 - cryptochrome 2 (CRY2)	0	-0,10	0,36	-0,29	0,77	0,93
			evm.model.Scaffold_315.646 (1 of 2) K12119 - cryptochrome 2 (CRY2)	0					
			evm.model.Scaffold_522.405 (1 of 2) K12118 - cryptochrome 1 (CRY1)	0					
			evm.model.Scaffold_214.241 (1 of 2) K12118 - cryptochrome 1 (CRY1)	0					
Cc06_g01460	CaLHCB4	Chlorophyll a-b binding protein CP29.2, chloroplastic~ LHCB4.2	evm.model.Scaffold_571.167 (1 of 1) K08915 - light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 4 (LHCB4)	0	1,02	0,49	2,10	0,04	0,25
Cc10_g16210	CaLHCB5	Chlorophyll a-b binding protein CP26, chloroplastic~ LHCB5	evm.model.Scaffold_622.8 (1 of 2) K08916 - light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 5 (LHCB5)	0	0,03	0,38	0,09	0,93	0,98
			evm.model.Scaffold_628.8 (1 of 2) K08916 - light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 5 (LHCB5)	0					
Cc04_g16410	CaLHCA4	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic~ LHCA4	evm.model.Scaffold_411.108 (1 of 2) K08910 - light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 4 (LHCA4)	1.5E-180	-0,25	0,31	-0,81	0,42	0,76
			evm.model.Scaffold_626.111 (1 of 2) K08910 - light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 4 (LHCA4)	1.6E-178					
Cc05_g15930	CaPsbR	Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplastic~ PSBR	evm.model.Scaffold_770.1142 (1 of 3) K03541 - photosystem II 10kDa protein (psbR)	7.5E-86	0,90	0,24	3,71	0,00	0,01
			evm.model.Scaffold_770.983 (1 of 3) K03541 - photosystem II 10kDa protein (psbR)	2.3E-78					
			evm.model.Scaffold_2501.4 (1 of 3) K03541 - photosystem II 10kDa protein (psbR)	2.3E-78					
gene1(chloroplast gene)	CaPsbA		ID=cds0;Parent=gene1;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89659.1;Name=ABJ89659.1;gbkey=CDS;gene=psbA;product=photosystem II protein D1;protein_id=ABJ89659.1;transl_table=11		1,03	0,26	4,01	0,00	0,01
gene28(chloroplast gene)	CaPsbD		ID=cds15;Parent=gene28;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89674.1;Name=ABJ89674.1;gbkey=CDS;gene=psbD;product=photosystem II protein D2;protein_id=ABJ89674.1;transl_table=11		1,24	0,35	3,54	0,00	0,02
gene57(chloroplast gene)	CaPetA		ID=cds33;Parent=gene57;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89692.1;Name=ABJ89692.1;gbkey=CDS;gene=petA;product=cytochrome f;protein_id=ABJ89692.1;transl_table=11		1,59	0,57	2,80	0,01	0,08
gene77(chloroplast gene)	CaPetD		ID=cds51;Parent=gene77;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89709.1;Name=ABJ89709.1;gbkey=CDS;gene=petD;product=cytochrome b6/f complex subunit IV;protein_id=ABJ89709.1;transl_table=11		1,92	0,45	4,27	0,00	0,00
gene76(chloroplast gene)	CaPetB		ID=cds50;Parent=gene76;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89708.1;Name=ABJ89708.1;gbkey=CDS;gene=petB;product=cytochrome b6;protein_id=ABJ89708.1;transl_table=11		1,85	0,44	4,17	0,00	0,00
gene36(chloroplast gene)	CaPsaA		ID=cds20;Parent=gene36;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89679.1;Name=ABJ89679.1;gbkey=CDS;gene=psaA;product=photosystem I P700 apoprotein A1;protein_id=ABJ89679.1;transl_table=11		2,04	0,52	3,91	0,00	0,01
gene35(chloroplast gene)	CaPsaB		ID=cds19;Parent=gene35;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89678.1;Name=ABJ89678.1;gbkey=CDS;gene=psaB;product=photosystem I P700 apoprotein A2;protein_id=ABJ89678.1;transl_table=11		1,90	0,47	4,08	0,00	0,00
gene66(chloroplast gene)	CaPsaI		ID=cds40;Parent=gene66;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89699.1;Name=ABJ89699.1;gbkey=CDS;gene=psaI;product=photosystem I subunit IX;protein_id=ABJ89699.1;transl_table=11		2,26	0,58	3,91	0,00	0,01
gene55(chloroplast gene)	CaYcf4		ID=cds31;Parent=gene55;Dbxref=NCBI_GP:ABJ89690.1;Name=ABJ89690.1;gbkey=CDS;gene=yfc4;product=photosystem I assembly protein ycf4;protein_id=ABJ89690.1;transl_table=11		2,21	0,69	3,20	0,00	0,04

Table S6: Genes involved in Calvin Benson Cycle. GPFA 124 hybrid was compared to Caturra at three time (ZT0,ZT6,ZT12). The color code represents significant up-regulation (red) and down-regulation (blue). For example, at ZT0, we observed a up regulation of the hybrid for CaRuBisCO SSU.

Locus ID	Name	Canephora annotation	Arabica annotation	E	ZT0				ZT6				ZT12			
					log2F ₀ lfcSE	stat	pvalue	padj	log2F ₀ lfcSE	stat	pvalue	padj	log2F ₀ lfcSE	stat	pvalue	padj
gene52	CaRuBisCO LSU	[chloroplast gene]	ID=cds28;Parent=gene52;bxref=NCBI_GP-ABJ89687.1;gbkey=CD5;gene=rbcl;product=ribulose-1%2C5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit;protein_id=ABJ89687.1;transl_table=11		1.4E-108	2.83	0.00	0.08	0.37	0.22	1.68	0.09	0.27	0.84	0.52	1.63
Cc00_g15710	CaRuBisCO S	Ribulose biphosphate carboxylase small chain SSU11A, chloroplastic~ RBC	evm.model.Scaffold_612.811 (1 of 2) PTHR31262-SF4 - RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A, CHLOROPLASTIC-RELATED		1.4E-108	0.53	0.42	3.30	0.00	0.03	0.65	0.45	3.68	0.00	0.00	0.00
Cc11_g00610	CaGAPA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic~ GAPA	evm.model.Scaffold_1629.111 (1 of 2) PTHR31262-SF4 - RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A, CHLOROPLASTIC-RELATED		0.00	0.54	0.20	2.69	0.01	0.10	0.57	0.58	2.71	0.01	0.04	0.36
			evm.model.Scaffold_1685.171 (1 of 4) 1.2.1.12/1.2.1.13 - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) / Triosephosphate dehydrogenase // Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP(+)) (phd)		0.00	0.00			0.00				0.00		0.00	0.00
			evm.model.Scaffold_1685.311 (1 of 4) 1.2.1.12/1.2.1.13 - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) / Triosephosphate dehydrogenase // Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP(+)) (phd)		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc02_g16530	CaTPI	Triosephosphate isomerase, chloroplastic~ TPIP1	evm.model.Scaffold_618.452 (1 of 4) PTHR21139-SF7 - TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE, CHLOROPLASTIC		0.00	1.14	0.40	2.84	0.00	0.08	1.01	0.40	2.56	0.01	0.06	-0.97
			evm.model.Scaffold_618.452 (1 of 4) PTHR21139-SF7 - TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE, CHLOROPLASTIC		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc11_g09330	CaFBA3	Probable fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic~ FBA3	evm.model.Scaffold_638.653 (1 of 2) PTHR11627-SF8 - FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 3, CHLOROPLASTIC-RELATED		0.00	0.19	0.25	0.77	0.44	0.77	0.19	0.30	0.64	0.52	0.74	-1.50
			evm.model.Scaffold_2421.432 (1 of 2) PTHR11627-SF8 - FRUCTOSE-BISPHOSPHATE ALDOLASE 3, CHLOROPLASTIC-RELATED		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc02_g11220	CaTKT	Transketolase, chloroplastic~ unknown_gene	evm.model.Scaffold_618.1115 (1 of 3) K00615 - transketolase (E2.2.1.1, tktA, tktB)		0.00	-1.17	1.33	-0.88	0.38	0.73	0.50	0.77	0.65	0.51	0.74	-4.75
			evm.model.Scaffold_637.149 (1 of 1) K0G0523 - Transketolase		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc02_g06960	CaSBPase	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplastic~ At3g55800	evm.model.Scaffold_637.659 (1 of 2) K01100 - sedoheptulose-bisphosphatase (E3.1.3.37)		0.00	0.83	0.22	3.77	0.00	0.01	1.45	0.48	3.03	0.00	0.02	0.79
			evm.model.Scaffold_2596.420 (1 of 2) K01100 - sedoheptulose-bisphosphatase (E3.1.3.37)		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc04_g15130	CaRPE	Ribulose-phosphate 3-epimerase, chloroplastic~ RPE	evm.model.Scaffold_411.65 (1 of 4) K01783 - ribulose-phosphate 3-epimerase (rpe, RPE)		0.00	0.54	0.30	1.79	0.07	0.36	0.74	0.43	1.73	0.08	0.25	1.03
			evm.model.Scaffold_626.63 (1 of 4) K01783 - ribulose-phosphate 3-epimerase (rpe, RPE)		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc02_g13860	CaTPT	Triose phosphate/phosphate translocator, chloroplastic~ TPT	evm.model.Scaffold_579.50 (1 of 1) PTHR11132/PTHR11132-SF102 - SOLUTE CARRIER FAMILY 35 // SUBFAMILY NOT NAMED		0.00	0.22	0.32	0.70	0.48	0.80	0.59	0.40	1.49	0.14	0.34	0.53
			evm.model.Scaffold_618.782 (1 of 1) PTHR11132/PTHR11132-SF124 - SOLUTE CARRIER FAMILY 35 // SUBFAMILY NOT NAME		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc10_g14740	CaFBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic~ unknown_gene	evm.model.Scaffold_622.201 (1 of 2) PTHR11556/PTHR11556-SF17 - FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED		0.00	0.39	0.30	1.30	0.19	0.56	0.35	0.53	0.66	0.51	0.73	1.55
			evm.model.Scaffold_628.233 (1 of 2) PTHR11556/PTHR11556-SF17 - FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE-RELATED // SUBFAMILY NOT NAMED		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc10_g02960	CaPGIC	Glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic~ PGIC	evm.model.Scaffold_522.940 (1 of 2) PTHR11469-SF1 - GLUCOSE-6-PHOSPHATE ISOMERASE, CYTOSOLIC		0.00	0.73	0.41	1.79	0.07	0.36	0.26	0.33	0.78	0.43	0.68	-0.18
			evm.model.Scaffold_214.747 (1 of 1) 3.2.1.39/3.3.1.9 - Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase / Laminarinase // Glucose-6-phosphate isomerase / Phosphosaccharomutase		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc11_g08200	CaPGM	Phosphoglucumutase, cytoplasmic~ PGM1	evm.model.Scaffold_638.527 (1 of 4) K01835 - phosphoglucumutase (pgm)		0.00	0.34	0.25	1.37	0.17	0.53	0.13	0.22	0.58	0.56	0.77	0.04
			evm.model.Scaffold_574.170 (1 of 4) K01835 - phosphoglucumutase (pgm)		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc07_g12830	CaUGPA	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase~ UGPA	evm.model.Scaffold_270.292 (1 of 3) K00963 - UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP2, galU, galF)		0.00	-0.10	0.42	-0.23	0.82	0.95	-0.30	0.24	-1.29	0.20	0.43	0.57
			evm.model.Scaffold_2256.329 (1 of 3) K00963 - UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP2, galU, galF)		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc10_g16060	CaSP54	Probable sucrose-phosphate synthase 4~ SP54	evm.model.Scaffold_622.25 (1 of 2) PTHR12526-SF358 - SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE 4-RELATED		0.00	-0.53	0.38	-1.39	0.16	0.52	0.00	0.44	-0.01	0.99	1.00	1.86
			evm.model.Scaffold_628.31 (1 of 2) PTHR12526-SF358 - SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE 4-RELATED		0.00				0.00				0.00		0.00	0.00
Cc06_g06940	CaSPP2	Sucrose-phosphatase 2~ SPP2	evm.model.Scaffold_671.1210 (1 of 2) 3.1.3.24 - Sucrose-phosphate phosphatase / Sucrose-6-phosphate phosphatase		0.00	0.43	0.24	1.80	0.07	0.35	0.52	0.22	2.42	0.02	0.08	0.46
			evm.model.Scaffold_571.774 (1 of 2) 3.1.3.24 - Sucrose-phosphate phosphatase / Sucrose-6-phosphate phosphatase		0				0				0		0	0.13

11

12

13

14

Table S7: Genes involved in Starch synthesis. GPFA 124 hybrid was compared to Caturra at three time (ZT0,ZT6,ZT12). The color code represents significant up-regulation (red) and down-regulation (blue). For example, at ZT0, we observed a up regulation of the hybrid for CaPPA1

Locus ID	Name	Canephora annotation	Arabica annotation	E	ZT0				ZT6				ZT12			
					log2Fo lfcSE	stat	pvalue	padj	log2Fo lfcSE	stat	pvalue	padj	log2Fo lfcSE	stat	pvalue	padj
Cc10_g15670	CaPGIP	Glucose-6-phosphate isomerase~ pgi	scaffold id		0	0,07	0,26	0,27	0,79	0,93	0,01	0,21	0,05	0,96	0,98	-0,17
			evm.model.Scaffold_2329.1 (1 of 5) K01810 - glucose-6-phosphate isomerase (GPI, pgi)		0											0,67
			evm.model.Scaffold_622.80 (1 of 5) K01810 - glucose-6-phosphate isomerase (GPI, pgi)		0											
			evm.model.Scaffold_628.91 (1 of 5) K01810 - glucose-6-phosphate isomerase (GPI, pgi)		0											
Cc02_g03610	CaPGMP	Phosphoglucumutase, chloroplastic~ PGMP	evm.model.Scaffold_637.1855 (1 of 2) 5.4.2.5 - Phosphoglucumutase (glucose-cofactor) / Glucose-1-phosphate phosphotransferase		0	-0,04	0,27	-0,16	0,87	0,97	0,25	0,34	0,72	0,47	0,70	2,08
			evm.model.Scaffold_637.1037 (1 of 2) 5.4.2.5 - Phosphoglucumutase (glucose-cofactor) / Glucose-1-phosphate phosphotransferase		0											
Cc02_g20460	CaPPA1	Soluble inorganic pyrophosphatase 1, chloroplastic~ PPA1	evm.model.Scaffold_634.1206 (1 of 3) PTHR10286-SF3 - INORGANIC PYROPHOSPHATASE		0	0,71	0,29	2,44	0,01	0,15	1,14	0,31	3,62	0,00	0,00	-0,36
Cc02_g01480	CaSS1	Soluble starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic~ At5g24300	evm.model.Scaffold_637.1621 (1 of 5) K00703 - starch synthase (E2.4.1.21, glgA)		0	-0,21	0,36	-0,58	0,56	0,84	0,11	0,26	0,43	0,66	0,84	-0,08
Cc07_g03430	CaSS2	Granule-bound starch synthase 2, chloroplastic/amyloplastic~ SS2	evm.model.Scaffold_952.508 (1 of 5) K00703 - starch synthase (E2.4.1.21, glgA)		0	0,08	0,32	0,24	0,81	0,94	0,38	0,21	1,79	0,07	0,23	-0,13
			evm.model.Scaffold_612.176 (1 of 5) K00703 - starch synthase (E2.4.1.21, glgA)		0											0,26
Cc08_g16970	CaGB55	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic~ WAXY	evm.model.Scaffold_465.1003 (1 of 3) K13679 - granule-bound starch synthase [EC:2.4.1.242] Glc a1-4 Glc (WAXY)		0	0,75	0,34	2,17	0,03	0,22	0,66	0,39	1,68	0,09	0,26	0,81
			evm.model.Scaffold_465.1046 (1 of 3) K13679 - granule-bound starch synthase [EC:2.4.1.242] Glc a1-4 Glc (WAXY)		0											0,30
			evm.model.Scaffold_2563.5 (1 of 3) K13679 - granule-bound starch synthase [EC:2.4.1.242] Glc a1-4 Glc (WAXY)		0											2,70
Cc10_g00640	CaSBE1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme~ SBE1	evm.model.Scaffold_214.1130 (1 of 2) PTHR10357-SF110 - PROTEIN T04A8.7, ISOFORM A		0	0,72	0,37	1,94	0,05	0,30	-0,69	0,63	-1,11	0,27	0,52	-1,19
			evm.model.Scaffold_214.997 (1 of 2) PTHR10357-SF110 - PROTEIN T04A8.7, ISOFORM A		0											0,27
Cc06_g05400	CaSBE2.1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 2-2, chloroplastic/amyloplastic~ SBE2.2	evm.model.Scaffold_671.1392 (1 of 2) PTHR10357-SF141 - 1,4-ALPHA-GLUCAN-BRANCHING ENZYME 2-1, CHLOROPLASTIC/AMYLOPLASTIC-RELATED		0	0,06	0,26	0,23	0,82	0,95	-0,30	0,26	-1,12	0,26	0,52	-1,55
			evm.model.Scaffold_571.606 (1 of 2) PTHR10357-SF141 - 1,4-ALPHA-GLUCAN-BRANCHING ENZYME 2-1, CHLOROPLASTIC/AMYLOPLASTIC-RELATED		0											0,21
Cc05_g14070	CaSBE3	1,4-alpha-glucan-branching enzyme 3, chloroplastic/amyloplastic~ SBE3	vm.model.Scaffold_770.1347 (1 of 1) PTHR10357-SF119 - 1,4-ALPHA-GLUCAN-BRANCHING ENZYME 3, CHLOROPLASTIC/AMYLOPLASTIC		0	-0,04	0,39	-0,11	0,91	0,98	0,09	0,24	0,38	0,70	0,86	-0,25
Cc10_g11550	CaISA1	Isoamylase 1, chloroplastic~ ISA1	evm.model.Scaffold_630.116 (1 of 4) K01214 - isoamylase (E3.2.1.68)		0	-0,05	0,60	-0,08	0,94	0,98	-0,13	0,60	-0,22	0,83	0,92	-0,06
			evm.model.Scaffold_521.23 (1 of 4) K01214 - isoamylase (E3.2.1.68)		0											0,34
			evm.model.Scaffold_2157.254 (1 of 3) PTHR10357-SF169 - ISOAMYLASE 1, CHLOROPLASTIC		0											-0,17
Cc08_g00630	CaISA2	Isoamylase 2, chloroplastic~ ISA2	evm.model.Scaffold_610.340 (1 of 10) 3.2.1.68 - Isoamylase / Debranching enzyme		0	0,32	0,34	0,95	0,34	0,70	-1,02	0,24	-4,29	0,00	0,00	-0,82
			evm.model.Scaffold_610.217 (1 of 10) 3.2.1.68 - Isoamylase / Debranching enzyme		0											0,33
Cc10_g06640	CaISA3	Isoamylase 3, chloroplastic~ ISA3	evm.model.Scaffold_214.300 (1 of 2) PTHR10357-SF74 - ISOAMYLASE 3, CHLOROPLASTIC		0	-0,29	0,36	-0,79	0,43	0,77	-0,26	0,23	-1,11	0,27	0,52	-0,86

15

Partie 4. Etude du transcriptome de variétés hybrides d'Arabica au cours de l'infection par la rouille orangée

Article en préparation

4.1 Contexte

Nous avons montré dans le chapitre 1 que quelles que soient les combinaisons de température, d'intensité lumineuse et de fertilisation azotée, les hybrides F1 GPFA 109 et GPFA 124 montrent une incidence plus faible de la rouille orangée que la variété lignée Caturra. Ces trois génotypes sont pourtant sensibles à ce pathogène. Même en absence de gènes spécifiques de résistance, les caféiers conservent une défense basale (non spécifique) qui peut leur permettre de limiter l'incidence de la rouille. Cet arsenal de défenses peut être exploité de manière à ce que les pertes occasionnées par le champignon soient économiquement acceptables. Pour autant, il faut que la plante soit à même de l'utiliser, c'est à dire de gérer efficacement le compromis croissance/défense et de disposer des ressources idoines. Comprendre ces mécanismes devrait permettre de faire les choix qui conduisent à des cultures en bonne santé, que ce soit en termes de combinaisons génotype/environnement, en termes d'itinéraires techniques ou encore d'amélioration génétique pour la création des variétés futures.

4.2 Stratégie

Afin de comprendre les bases moléculaires de la moindre infestation de la rouille sur les 2 hybrides F1, nous avons étudié l'expression des gènes par une approche RNAseq lors de la cinétique d'infestation : au temps zéro (T0), 24 heures après infestation (24), 48h après infestation (48h) et 7 jours après infestation (7J) pour le régime thermique le plus haut, pour plusieurs combinaisons d'intensité lumineuse et de fertilisation azotée, ce qui représente l'étude de 96 banques RNAseq. L'objectif consiste à identifier les gènes ayant un rôle dans la moindre incidence de la rouille sur les hybrides. Pour y parvenir nous avons développé un algorithme original basé sur les scores de Fisher qui permet de faire un score reliant le niveau de transcription d'un gène à l'importance d'un caractère phénotypique. Nous avons appliqué cet algorithme sur 72 banques RNAseq (T0, 48h et 7J) et nous présentons les résultats d'une sélection de gènes dont l'expression est reliée à la quantité de spores de rouille récoltées à 43 jours après inoculation (soit à la fin du cycle du pathogène).

4.3 Conclusions

La méthodologie que nous avons imaginée nous a permis de sélectionner des gènes, dont la fonction est majoritairement liée à des mécanismes de défense de la plante ou à des voies de signalisation associées chez l'hybride et majoritairement liées à une réponse aux stress abiotiques chez la variété lignée Caturra. Notre méthodologie s'est donc révélée adaptée pour répondre à la question posée. C'est bien l'état de stress de Caturra qui l'empêche de lutter efficacement contre le pathogène. Au contraire la réponse de l'hybride est plus massive, plus diversifiée et au final beaucoup plus efficace. Le gène WRKY40 exprimé chez les hybrides semble important dans cette réponse et devra être examiné de façon plus approfondie en recherchant des gènes liés au compromis croissance/résistance dont l'expression pourrait être significative à 24 heures.

D'ores et déjà une approche basée sur l'algorithme que nous avons développé nous semble envisageable pour éliminer les plantes les plus sensibles. Elle permettrait une sélection négative précoce et indirecte sur la base du fort niveau d'expression d'un nombre déterminé et faible de gènes (<10) liés aux stress oxydatifs des plantes soumises à des conditions environnementales défavorables pour ne conserver que celles qui ne présentent pas de sur-expression.

4.4 Article

Etude du transcriptome de variétés hybrides d'Arabica au cours de l'infection par la rouille orangée

4.4.1 Introduction

Il existe deux types de défenses mises en place par les plantes face aux agents pathogènes : les défenses constitutives et les défenses induites.

Les défenses constitutives ne nécessitent pas la perception du pathogène. Elles sont d'ordre structural et biochimique (épaisseur de la cuticule, structure des cellules épidermiques, épaisseur de la paroi pectocellulosique, fermeture programmée des stomates à certaines heures de la journée, ...). Par ailleurs, les plantes sont capables de percevoir spécifiquement un pathogène et de répondre à une infection par une réponse immune, impliquant par exemple la production de métabolites secondaires ayant des activités antimicrobiennes (Field, Jordán and Osbourn, 2006).

Contrairement aux défenses constitutives, les réactions de défenses induites sont mises en place lorsque les plantes détectent l'agent pathogène et font face à l'infection grâce à une batterie de réactions de défense. Il existe deux types de réaction de défenses induites : la résistance spécifique et la résistance non spécifique. Nos expérimentations se placent dans le cadre de la résistance non spécifique.

La résistance non spécifique appelée PTI ("PAMP-Triggered Immunity" ou Immunité médiée par les PAMPs) n'est pas basée sur une reconnaissance spécifique d'un gène de résistance par le produit d'un gène d'avirulence mais sur la reconnaissance de motifs moléculaires ubiquitaires et peu polymorphes de l'agent pathogène : les PAMPs ("Pathogen-Associated Molecular Patterns") et les DAMPs (« Damage-Associated Molecular Patterns ») (Jones and Dangl, 2006). Les PAMPs sont des éliciteurs exogènes tels que la chitine présente chez les champignons (Jones and Dangl, 2006; Dodds and Rathjen, 2010). Les DAMPs sont des éliciteurs endogènes tels que les produits de dégradation de paroi ou des fragments de cuticule libérés lors de l'infection par l'agent pathogène (Huffaker, Pearce and Ryan, 2006; Hükelhoven, 2007). Ces différents éliciteurs sont perçus par des protéines particulières de la plante, les PRRs (« Plant patternrecognition receptors ») (Zipfel, 2014). Ce sont des récepteurs transmembranaires de type RK (« Receptor Kinase » ou Récepteur

Kinase) contenant un domaine kinase intracellulaire et un domaine récepteur extracellulaire de type LysM ou LRR (« Leucine Rich Repeat » ou domaine riche en leucine), ou de type RLP (« Receptor Like Proteins ») qui partagent la même structure que les RKs mais n'ont pas de domaine kinase cytoplasmique. Les RLPs fonctionnent le plus souvent en association avec des protéines RKs qui permettent la transduction du signal (Zipfel, 2014).

Concernant notre modèle d'étude *C. arabica*, quelques gènes de résistance non spécifiques ont été identifiés. Cacas *et al.* (2011) ont mis en évidence la présence du gène NDR1 chez Arabica dont la fonction était déjà connue chez *Arabidopsis*. Ce gène est impliqué dans les mécanismes de défense non spécifique et semble de ce fait intéressant dans le cadre d'une résistance à large spectre. Dans une étude de Ramiro *et al.* (2010), deux gènes issus de la famille des facteurs de transcription WRKY sont exprimés dans les feuilles. Les facteurs de transcription WRKY ont un rôle important dans la régulation des stress biotiques chez les plantes (Pandey et Somssich, 2009; Jiang et al., 2017). Ils régulent également la voie de biosynthèse de composés de défenses comme les phénylpropanoïdes (Schlutenhofer and Yuan, 2015). Néanmoins, l'étude de Ramiro *et al.* (2010) n'a pas pu montrer que les gènes issus de la famille des facteurs de transcription WRKY étaient activés par la rouille, des blessures, la maturation du fruit ou la sénescence.

Dans ce contexte, nous cherchons à comprendre les bases moléculaires de la moindre infestation observée sur des hybrides F1 en comparaison à la variété lignée Caturra. Cela sous entend, a priori, que la réponse constitutive et/ou non spécifique (PTI) doit être différente chez les hybrides. Cette différence pourra être qualitative avec par exemple un meilleur « timing » dans la mise en place des réponses ou quantitative en proposant une réponse plus intense en lien avec une meilleure gestion du compromis croissance/défense. A cette fin, un dispositif expérimental a été mis en place afin d'étudier le comportement des deux types d'Arabica, lignée vs hybrides, cultivés avec deux niveaux de fertilisation et deux niveaux d'intensité lumineuse en condition de stress thermique. Des prélèvements de feuilles ont été faits au cours de la cinétique d'infestation : juste avant l'infestation, 24h après infestation, 48h après infestation et 7 jours après infestation afin d'identifier les gènes candidats ayant un rôle dans la plus faible infestation chez les hybrides. Nous avons mis au point un algorithme basé sur l'utilisation d'un score de Fisher permettant de sélectionner ces gènes candidats. Nous avons appliqué cet algorithme sur 72 banques RNAseq (T0, 48h et 7J).

4.4.2 Matériel et Méthodes

4.4.2.1 Matériel végétal

Le matériel végétal ainsi que les conditions d'inoculation et de suivi macroscopique ont été décrits dans le chapitre 1.

Pour rappel, nous avons étudié 3 génotypes sensibles à la rouille orangée : la variété lignée Caturra ainsi que les hybrides GPFA 109 et GPFA 124. Le dispositif expérimental comprend 4 conditions décomposées de la manière suivante : Régime thermique (1) x Fertilisation azotée (2) x Intensité lumineuse (2).

4.4.2.2 Prélèvements

Les échantillons de feuilles ont été prélevés avant inoculation, 24h après inoculation, 48h après inoculation et 7 jours après inoculation, uniquement pour le régime thermique (27-22°C). Concernant Caturra, les échantillons issus des quatre traitements ont été prélevés (forte lumière/faible azote ; forte lumière/fort azote, faible lumière/fort azote, faible lumière/faible azote). En revanche, pour les hybrides, seuls les traitements donnant les niveaux de rouille les plus contrastés ont été prélevés (forte lumière/faible azote et faible lumière/fort azote). Les feuilles ont été immédiatement plongées dans l'azote liquide puis conservées à -80°C avant extraction des ARN.

4.4.2.3 Extraction d'ARN, séquençage et bioinformatique

Les ARN ont été extraits à partir de 100 mg de feuilles comme décrit dans (Breitler *et al.*, 2016). La construction des banques et le séquençage ont été effectués par la plateforme MGX. (Montpellier GenomiX, Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier; www.mgx.cnrs.fr/) comme décrit dans le chapitre 2. Après comparaison entre les gains obtenus avec du « single read 50 » ou « single read100 » et compte tenu de la différence de prix importante, nous avons choisi d'utiliser des « single read » de 50 nucléotides (Table S1). Les reads ont été alignés à la séquence génomique de référence de *C. canephora* (Denoeud *et al.*, 2014) étant donné que le génome d'Arabica, pourtant séquencé, n'est pas encore disponible, ainsi qu'au génome chloroplastique d'Arabica (Samson *et al.*, 2007) en utilisant le logiciel TopHat v2.1.1 (Kim *et al.*, 2013) avec les paramètres suivants : --read-mismatches 3

–read-gap-length 3 –read-edit-dist 3. Les reads non alignés ou alignés à plusieurs endroits du génome ont été exclus des analyses tandis que le nombre de reads alignés de manière unique pour chaque gène a été compté en utilisant Htseqcount avant de réaliser une étude d’expression différentielle en utilisant DESeq 2 (Love, Huber et Anders, 2014).

4.4.2.4 Indicateur de la quantité de rouille

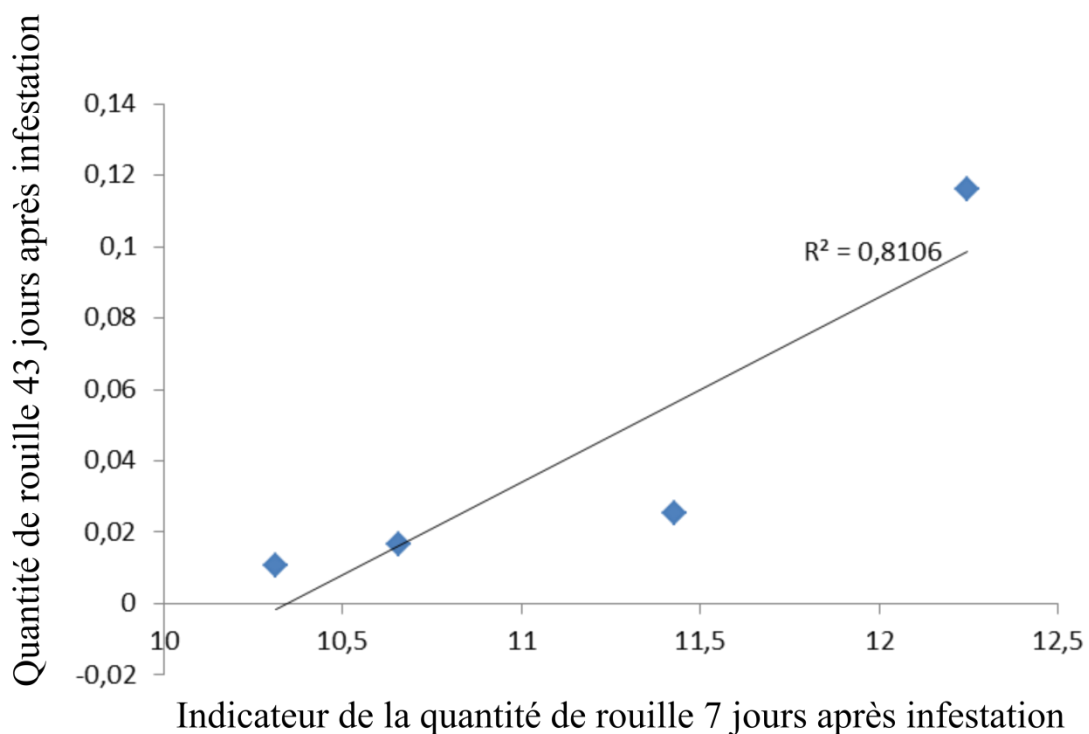


Fig. 23: Corrélation entre la quantité de rouille 43 jours après infestation et l'indicateur de la quantité de rouille 7 jours après infestation pour la variété lignée Caturra.

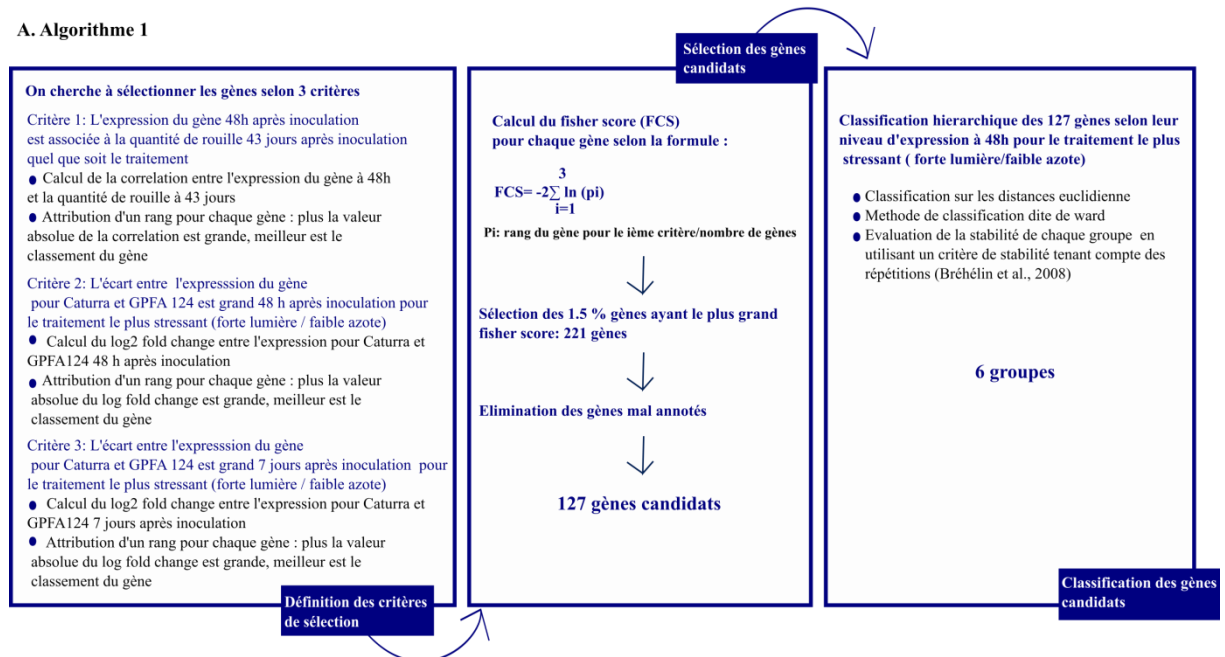
Nous cherchons à corréler l’expression des gènes à la quantité de rouille car la valeur de cette corrélation constitue un critère permettant de détecter les gènes candidats expliquant la moindre infestation chez les hybrides. Afin de gagner en pouvoir statistique, nous avons créé un indicateur rendant compte de la quantité de rouille à 7 jours. En effet, cette opération permet de corréler directement chaque banque à l’indicateur sans faire la moyenne des 3 répétitions biologiques. L’indicateur de rouille à 7 jours est calculé grâce au pourcentage de reads non alignés à 7 jours. En effet, nous faisons l’hypothèse que le nombre de reads non alignés sur le génome du caféier varie en fonction de l’ADN de rouille, et reflète donc la quantité de rouille présente dans nos échantillons. Nous avons vérifié notre indicateur en le corrélant à la quantité de rouille obtenue 43 jours après inoculation. La corrélation est

hautement significative chez Caturra (**Fig. 23**). Chez les hybrides, nous n'avons étudié que deux traitements donc nous n'avons que deux points de moyenne, ce qui nous empêche de calculer un coefficient de corrélation. Nous observons néanmoins que plus l'indicateur de la quantité de rouille est élevé, plus la quantité de rouille 43 jours après infestation est importante.

Nous avons bâti cet indicateur uniquement pour 7 jours, à 48h nous utiliserons la moyenne de quantité de rouille obtenue 43 jours après infestation sur les 3 réplicas pour effectuer la corrélation avec l'expression des gènes.

4.4.2.5 Algorithme de détection de gènes candidats

A. Algorithme 1



B. Algorithme 2

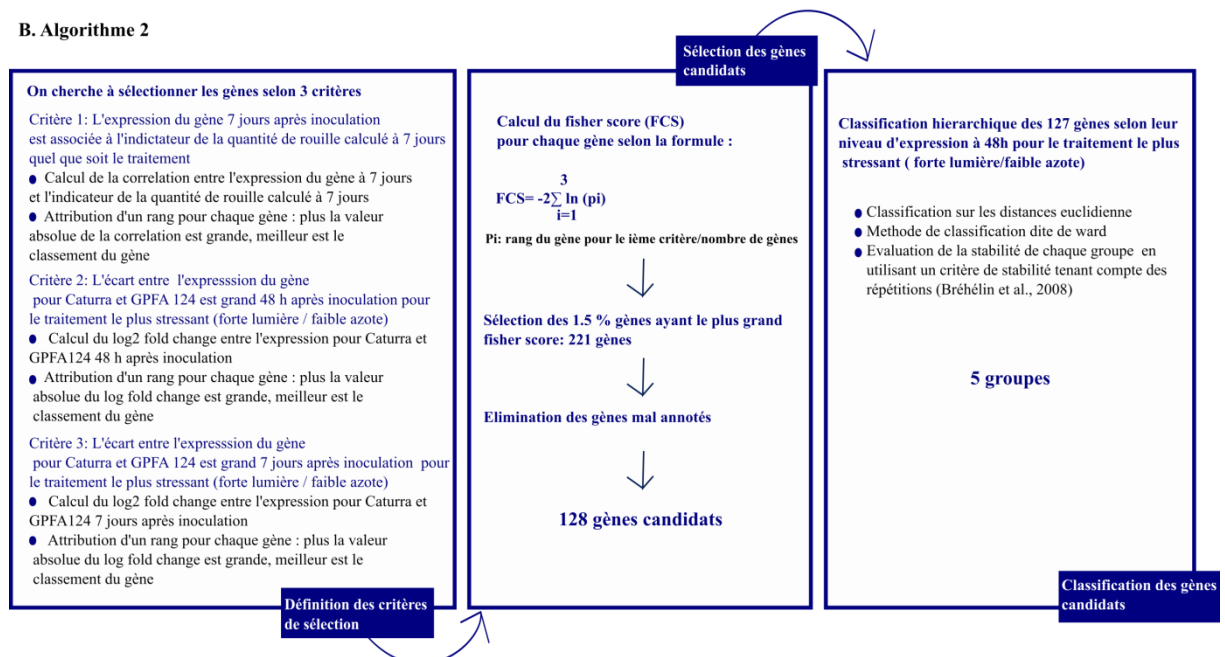


Fig. 24: Développement de deux algorithmes permettant de détecter des gènes candidats. A. Algorithme 1 B. Algorithme 2.

Deux algorithmes ont été développés afin de sélectionner les gènes pouvant expliquer le niveau d'infestation plus faible observé chez les hybrides : l'algorithme 1 et l'algorithme 2 (Fig. 24). Ces algorithmes nous permettent, en se basant sur l'utilisation d'un « Score de Fisher », de sélectionner les gènes sur la base de plusieurs critères sans aucune hypothèse sur la distribution normale des données. Ces algorithmes comprennent 3 étapes : 1/ Définition des critères de sélection et classement des gènes, 2/ Intégration des classements dans un « Score

de Fisher » et sélection des 1,5 % des gènes ayant le plus grand score, 3/ classification hiérarchique des gènes candidats afin d'identifier les groupes de gènes s'exprimant de la même manière pour le traitement le plus stressant à savoir forte lumière et faible azote. Cette classification a été réalisée en utilisant les distances euclidiennes et la méthode de classification hiérarchique dite de Ward. La stabilité de chaque groupe a été évaluée en utilisant un critère de stabilité tenant compte de la variabilité biologique (répétitions) (Bréhélin, Gascuel et Martin, 2008). L'algorithme 1 permet la sélection de gènes candidats s'exprimant de façon précoce (48h après infestation). Les 3 critères de sélection sont les suivants : l'expression du gène 48h après inoculation est associée à la quantité de rouille récoltée 43 jours après inoculation quel que soit le traitement (plus la valeur absolue de la corrélation est grande, meilleur est le classement du gène), l'écart entre l'expression du gène pour Caturra et GPFA 124 est grand 48h après inoculation pour le traitement le plus stressant (forte lumière/ faible azote), l'écart entre l'expression du gène pour Caturra et GPFA 124 est grand 7 jours après inoculation pour le traitement le plus stressant (forte lumière/ faible azote). 127 gènes candidats sont ainsi sélectionnés et classés en 6 groupes. L'algorithme 2 permet de détecter les gènes candidats dont le rôle dans la moindre infestation est plus tardif. Les critères de sélections sont identiques à ceux de l'algorithme 1 à l'exception du critère de corrélation qui est le suivant : l'expression du gène 7 jours après inoculation est associée à l'indicateur de quantité de rouille à 7 jours (présenté au paragraphe précédent) quel que soit le traitement (plus la valeur absolue de la corrélation est grande, meilleur est le classement du gène). 128 gènes sont ainsi sélectionnés et classés en 5 groupes.

4.4.2.6 Enrichissement en termes « Gene Ontology » (GO)

L'enrichissement en termes GO a été réalisé sur le site agriGO V2 en utilisant la « Singular Enrichment Analysis » (Tian *et al.*, 2017).

4.4.3 Résultats et discussion

Notre dispositif d'étude est complexe et conduit à l'étude de 72 banques RNAseq. En effet, nous avons étudié 3 points de cinétiques x 4 conditions différentes et 3 points de cinétique x 2 conditions différentes pour la variété lignée Caturra et l'hybride F1 GPFA124 respectivement. Nous cherchons à identifier les gènes ayant un rôle dans la moindre incidence de la rouille sur les hybrides ou ceux qui pourraient expliquer la plus grande incidence chez Caturra.

En intégrant des données de transcriptomiques et phénotypiques, les analyses de corrélation entre transcrits et données phénotypiques permettent de détecter des Quantitative Trait Transcrit (QTT). Il s'agit d'une relation quantitative (régression linéaire) entre le niveau de transcription d'un gène et le niveau d'un caractère phénotypique (Mackay, Stone et Ayroles, 2009). Xue, Wang et Zhu (2017) ont associé 81 QTT à la variation de sursaut chez la drosophile *Melanogaster*. L'approche QTT telle que décrite par ces auteurs aurait pu être utilisée dans notre étude. Néanmoins, elle n'était pas optimale du fait de notre dispositif. En effet, elle permettrait d'identifier un trop grand nombre de gènes (333 pour le temps 7 jours) et de ne traiter qu'un point de la cinétique à la fois. L'algorithme que nous avons développé permet à la fois d'intégrer la corrélation entre la quantité de rouille et les transcrits, mais aussi d'affiner la sélection en insistant sur les différences entre les hybrides et la lignée. En effet, la corrélation est calculée entre génotypes dans les différents environnements et permet donc de détecter des gènes corrélés à la rouille variant entre les différents environnements et/ou entre la lignée et les hybrides. Notre algorithme utilise un score de Fisher et permet de centrer la sélection sur les gènes impliqués dans la moindre incidence observée sur les hybrides en rajoutant les critères de maximisation de l'écart d'expression entre Hybrides et Caturra à 48 h et 7 jours. Le score de Fisher est une méthode composite, fréquemment utilisée pour détecter des signaux de sélection en combinant plusieurs critères différents comme dans l'étude de Deschamps *et al.* (2016).

Afin d'élaborer une liste de gènes candidats ayant un rôle précoce (algorithme 1) ou plus tardif (algorithme 2) dans la réduction du niveau d'infestation observée chez les hybrides, une valeur de score de Fisher a été calculée pour chaque gène. Plus le gène remplit les 3 critères, plus grande est la valeur de son score de Fisher.

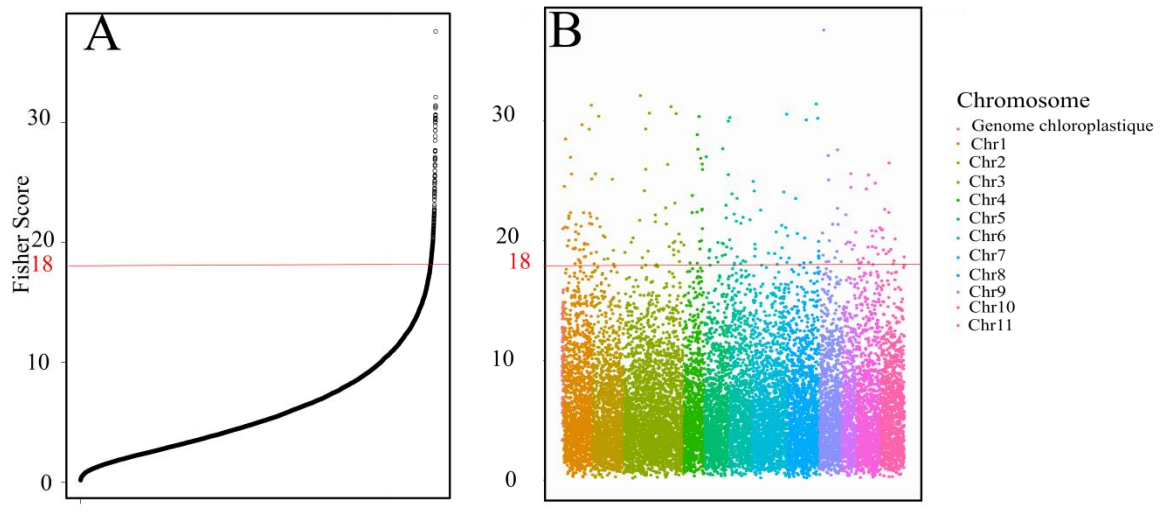


Fig. 25: Distribution des valeurs de Score de Fisher calculées avec l'algorithme 1 A. Courbe de distribution des valeurs de Score de Fisher B. Manhattan plot des valeurs de Score de Fisher. La ligne rouge représente un seuil qui indique que les gènes ayant un Score de Fisher supérieur à 18 ont été sélectionnés comme gènes candidats.

La **Fig. 25** montre la distribution des valeurs de Score de Fisher calculées avec l'algorithme 1. La distribution est très semblable pour l'algorithme 2. Seul un petit nombre de gènes ont des valeurs élevées. Nous avons choisi de considérer comme candidats les gènes ayant un Score de Fisher faisant partie des 1.5 % des valeurs les plus hautes, soit à partir d'un score de 18 (**Fig. 25A**). Les gènes candidats (Score de Fisher >18) sont répartis de manière homogène sur les différents chromosomes. Le pourcentage de gènes candidats par rapport au nombre de gènes présents sur le chromosome varie de 0.95 à 1.90 %. Seul le chromosome 0 (gènes non assignés à un chromosome) a un pourcentage de gènes candidats légèrement plus élevé avec une valeur de 3.3 %.

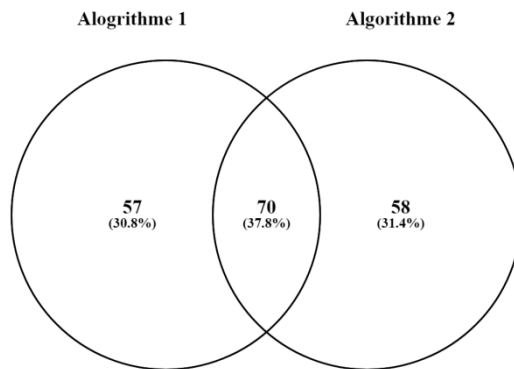


Fig. 26: Diagramme de Venn des listes de gènes issues des algorithmes 1 et 2.

185 gènes candidats ont été sélectionnés via les deux algorithmes : 70 gènes sont détectés à la fois en utilisant l'algorithme 1 et 2, 57 gènes sont détectés uniquement en utilisant l'algorithme 1 et 58 gènes uniquement en utilisant l'algorithme 2. Ainsi, 70 gènes ont une expression corrélée à la rouille à la fois à 48h et à 7 jours. 57 gènes s'expriment de façon précoce à 48h en réaction à l'infestation puis ne s'expriment plus à 7 Jours. 58 gènes ont un rôle dans la moindre infestation des hybrides uniquement à partir de 7 jours après infestation.

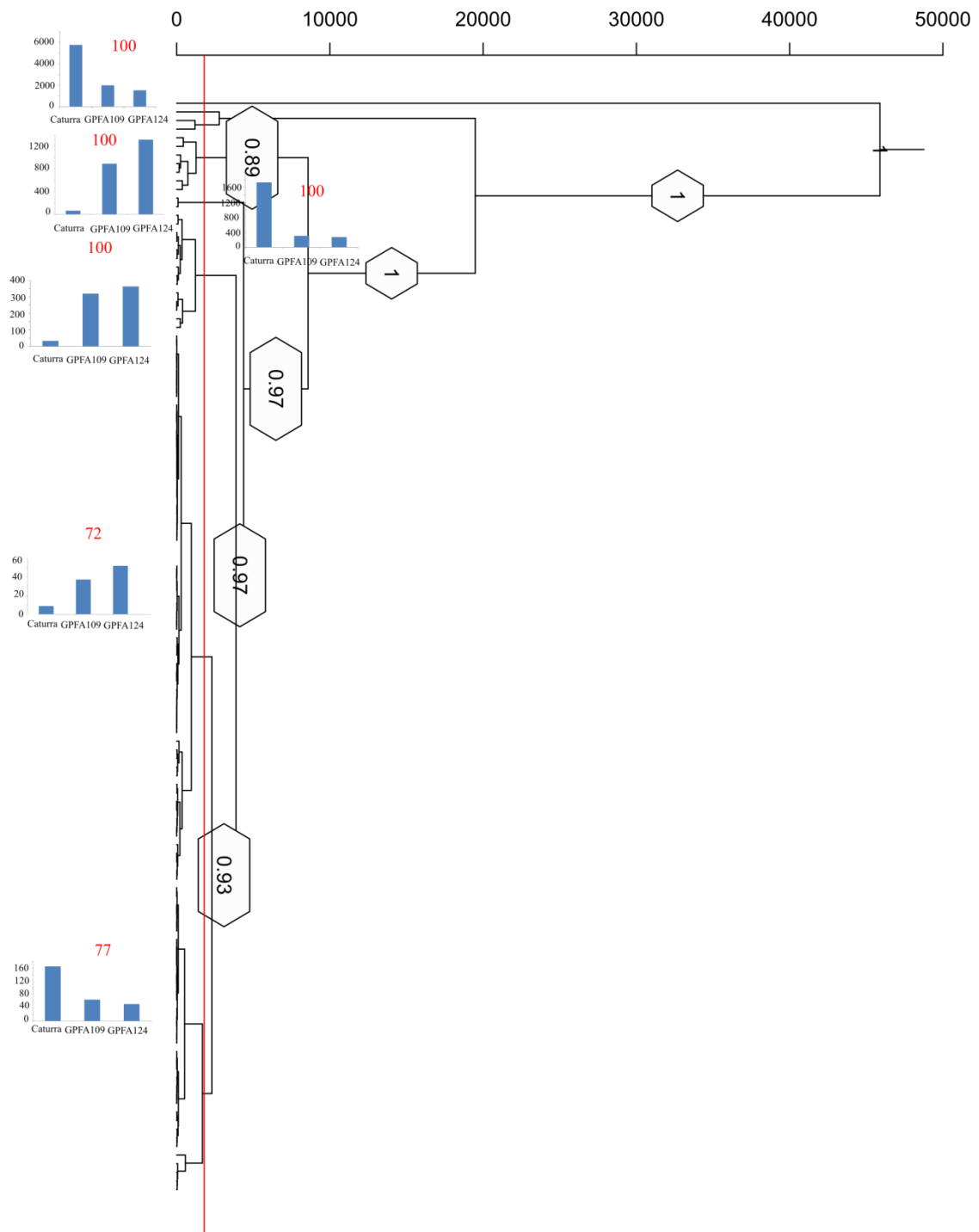


Fig. 27: Classification hiérarchique de l'expression à 48h des gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 1. La classification a été réalisée sur l'expression à 48h sous le traitement le plus stressant (forte lumière faible azote). La ligne rouge représente le seuil utilisé pour définir les groupes. Chaque histogramme représente le profil moyen d'expression pour chaque groupe de gènes. La valeur écrite en rouge correspond au pourcentage de gènes différentiellement exprimés entre Caturra et l'hybride GPFA124. Les valeurs écrites en noir dans des hexagones représentent l'indice de stabilité du groupe tel que défini par Bréhélin, Gascuel et Martin (2008).

Les gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 1 sont subdivisés en 6 groupes de gènes ayant des profils d'expression similaires (**Fig. 27**). La classification a été réalisée sur la base de l'expression des gènes à 48h. Les différents profils d'expression présents peuvent être décrits par le niveau d'expression (groupe de gènes peu exprimés ou groupe de gènes fortement exprimés) et le niveau d'expression chez les hybrides par rapport à Caturra (expression supérieure ou inférieure chez Caturra). Quel que soit le groupe, la majorité des gènes le constituant sont différentiellement exprimés entre Caturra et l'hybride GPFA124 avec des pourcentages allant de 72 à 100 %, les valeurs les plus faibles étant observées pour les groupes de gènes peu exprimés. Trois groupes de gènes ont une expression à 48h plus importante chez Caturra que chez les hybrides : le premier groupe constitué de gènes fortement exprimés (2000-6000), le second de gènes ayant une expression moyenne (400-1600) et le troisième groupe constitué de gènes faiblement exprimés (40-160). Trois groupes de gènes ont une expression à 48h plus importante chez les hybrides comparée à Caturra. Ils se distinguent également par leur niveau d'expression faible, moyen ou fort.

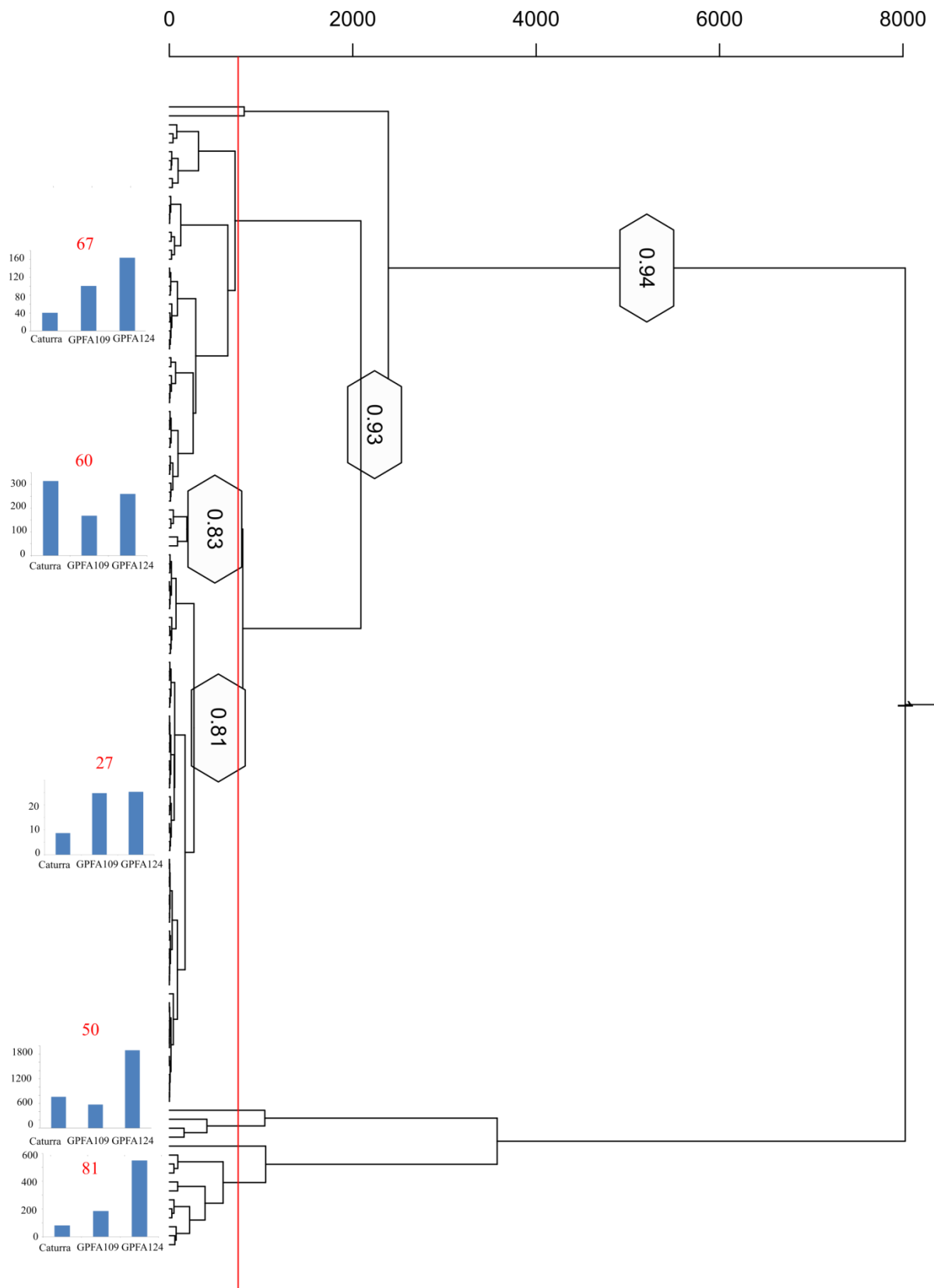


Fig. 28: Classification hiérarchique de l'expression 7 jours après infestation des gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 2. La classification a été réalisée sur l'expression 7 jours après infestation sous le traitement le plus stressant (forte lumière faible azote). La ligne rouge représente le seuil utilisé pour définir les groupes. Chaque histogramme représente le profil moyen d'expression pour chaque groupe de gène. La valeur écrite en rouge correspond

au pourcentage de gènes différenciellement exprimés entre Caturra et l'hybride GPFA124. Les valeurs écrites en noir dans des hexagones représentent l'indice de stabilité du groupe tel que défini par Bréhélin, Gascuel et Martin (2008).

Les gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 2 sont subdivisés en 5 groupes de gènes ayant des profils d'expression similaires (**Fig. 28**). La classification a été réalisée sur l'expression des gènes 7 jours après infestation. Les niveaux d'expression des gènes à 7 jours sont sensiblement plus faibles que les niveaux d'expression 48h après infestation. Le nombre de gènes différenciellement exprimés par groupe est également plus faible. Un groupe constitué de 5 gènes présente une expression à 7 jours légèrement supérieure chez Caturra comparé aux hybrides. Un groupe constitué de 3 gènes a une expression équivalente chez Caturra et l'hybride le plus sensible GPFA109 et une expression plus forte chez l'hybride GPFA124. Les trois autres groupes présentent une expression plus importante chez les deux hybrides et se distinguent uniquement par leur niveau d'expression très faible (10-20), faible (40-160) et moyenne (200-600).

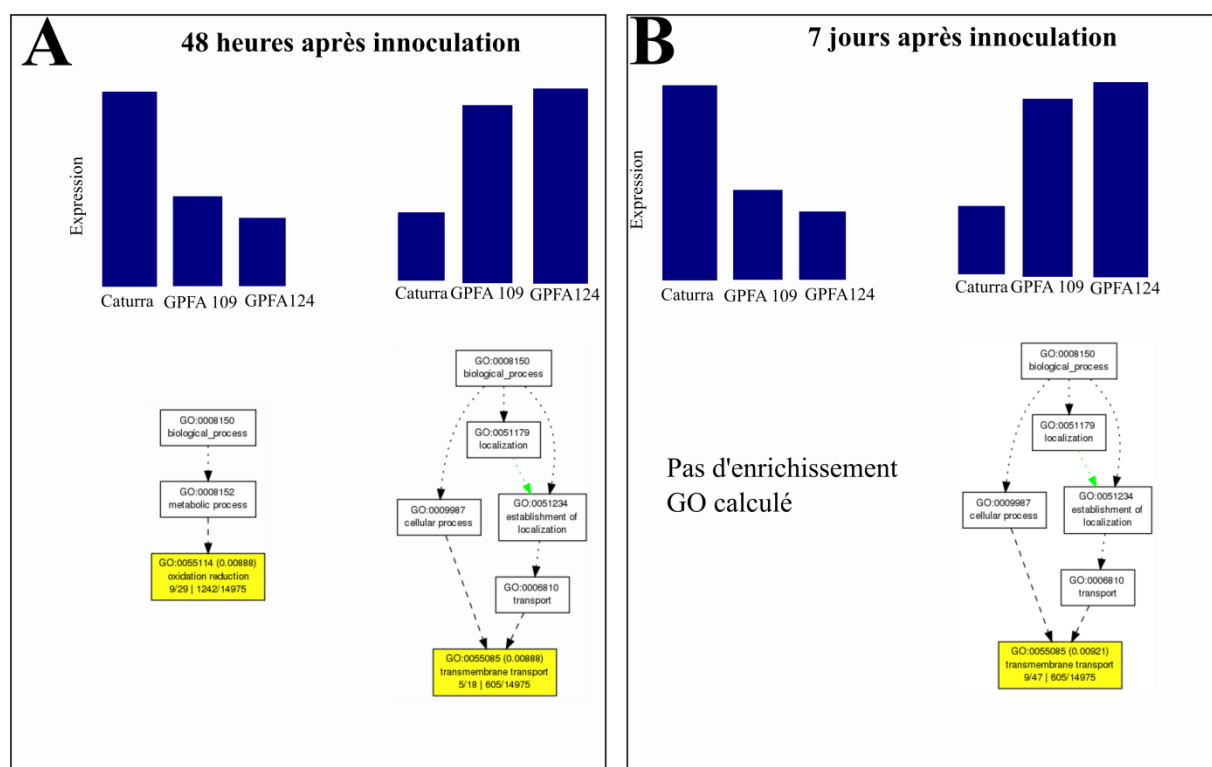


Fig. 29: Enrichissement GO des différents profils d'expression A. 48 heures après inoculation B. 7 jours après inoculation. L'histogramme schématise les deux cas de figure observés. Cas 1 : l'expression observée pour Caturra est supérieure à l'expression observée pour les hybrides ; cas 2 : l'expression observée pour les hybrides est supérieure à l'expression observée pour Caturra. Les rectangles représentent les termes GO calculés sur tous les clusters présentant le profil illustré par l'histogramme. A 7 jours, l'enrichissement GO n'a pas pu être calculé pour le premier profil d'expression du fait du faible nombre de

gènes (5). Une flèche verte représente une régulation négative ; une flèche noire représente une régulation positive.

48h après infestation, les groupes dont l'expression est supérieure chez Caturra en comparaison avec les hybrides montrent un enrichissement en termes GO relevant de l'oxydo-réduction. A contrario, les groupes dont l'expression est supérieure chez les hybrides en comparaison avec Caturra présentent un enrichissement en termes GO relevant du transport membranaire à la fois à 48h et 7 Jours. Inada et Ueda, (2014) ont expliqué la grande importance du transport membranaire dans les interactions plantes/pathogènes. Du fait du faible nombre de gènes présentant ce profil (5), l'enrichissement en terme GO n'a pas pu être calculé 7 jours après infestation pour les profils d'expression présentant une expression supérieure pour Caturra.

Table 1: Tableau récapitulatif des fonctions des principaux gènes candidats. Les gènes sur-exprimés chez Caturra à T0 et 7J sont grisés. Ceux en blanc sont sur- exprimés chez les hybrides. Les voies de signalisation sont signalées entre parenthèses quand elles sont connues.

Gènes étudiés	Expression forte à T0 (prédisposition)	Expression max. 48 heures après infection	Expression max. 7 jours après infection
PSBT :PSII Cc06_g23280	Photosystem Redox (lié aussi aux stress abiotiques)		Photosystem Redox (lié aussi aux stress abiotiques)
Chlorophyll a/b binding Cc05_g09930	Photosystem (lié aussi aux stress abiotiques)		Photosystem (lié aussi aux stress abiotiques)
Plastocyanin, chloroplastique~ PETE Cc10_g01080	Photosystem (lié aussi aux stress abiotiques)		Photosystem (lié aussi aux stress abiotiques)
Polyphenol oxydase chloroplastique Cc05_g1025	Photosystem Redox		Photosystem Redox
Aspartic Protease in Guard Cell 1 Cc04_g09640	Stress hydrique (ROS), contrôle de la fermeture stomatique		Stress hydrique (ROS), contrôle de la fermeture stomatique
Zinc transporter 5~ ZIP5 member of Fe(II) transporter Cc03_g12170	Detoxification des métaux (Zn et/ou Fe) Voie des phénylpropanoïdes ou état rédox		
Dehydrin DH1a Cc07_g10030	résistance au stress hydrique (ABA)		
Major latex protein 28 Cc03_g11020	signalisation (Br-ABA-Cyt)		
WRKY40 Cc08_g07850		MAMPs ou DAMPs (ABA)	
Pathogenesis-related protein Cc02_g20290		MAMPs ou DAMPs Régulation négative par JA Sous contrôle négatif des WRKYs	
ABC transporter C family member 9 Cc10_g12380		Cible de WRKY40 (ABA)	
Aldehyde dehydrogenase family 2 member C4~ ALDH2C4 Cc04_g11660		Voie des phénylpropanoïde	
dammarenediol-II synthase Cc10_g10160		MAMPs ou DAMPs active l'expression des PRs (JA)	
Ferric reduction oxidase 7, chloroplastic~ FRO7 Cc02_g36770			Photosystem REDOX
Linoleate 9S-lipoxygenase 5 Cc02_g33780		Cible de WRKY (JA)	
SAR Cc03_g09000	SAR		
MIK2, LRR récepteur kinase transmembranaire Cc03_g08600		DAMPs (JA) senseur intégrité des parois	
12-oxophytodienoate reductase Cc09_g03820			DAMPs (JA) biosynthèse jasmonate
Aspartic Protease in Guard Cell 1 Cc04_g09640			Stress hydrique (ROS), contrôle de la fermeture stomatique (ABA)
Alpha-galactosidase 1 - AGAL1 Cc11_g00330			Participe à la réorganisation des parois cellulaires Voie des phénylpropanoïdes ou état rédox
UDP-glycosyltransferase Cc01_g15810 - Cc01_g01130			Voie Acide salicylique (SA)
Cellulose synthase A catalytic subunit Cc06_g14690 - Cc01_g17930 - Cc02_g15480			MAMPs ou DAMPs active l'expression des PRs (JA)
Disease resistance protein RGA3 Cc02_g26510			protéine RGA3 (ABA) résistance aux maladies
14 kDa proline-rich protein DC2.15 Cc08_g12770		protéine de défense (ABA)	
Major latex protein 423 Cc11_g01060		Structure similaire à PYR3 (ABA)	
Sugar transport protein 13 - STP13 Cc03_g03550		Importation hexoses extra-cellulaire Réduire les ressources du pathogène, fournir de l'énergie à la cellule.	
germin-like 2 Cc10_g09820			Réponse au pathogène, production de H2O2
Nitrate reductase 2 - NIA2 Cc00_g12040		Production d'oxyde nitrique. Signal pour la synthèse de gènes de défense et réponse HR	

Parmi les gènes candidats identifiés, nous en avons sélectionné un certain nombre qui sont cités dans la littérature traitant des relations plantes/pathogènes. Ils ont été classés en fonction de leur pic d'expression, de leur niveau d'expression à T0, de leurs fonctions et de leur régulation par les hormones végétales impliquées dans les relations plantes /champignons ou bactéries (Table 1).

Il y a peu de gènes surexprimés chez Caturra en comparaison avec les deux hybrides. Les gènes surexprimés chez Caturra sont majoritairement des gènes déjà très fortement exprimés à T0 (6 gènes sur 8). Seuls deux gènes sont surexprimés chez Caturra en réponse à l'infection. Il s'agit d'un gène impliqué dans la voie de la réponse systémique acquise (SAR) et un gène lié au ROS (Reactive Oxygen Species).

Les gènes qui caractérisent la réponse de Caturra sont également majoritairement des gènes liés au fonctionnement du photosystème et notamment à son état Redox. 48 heures ou 7 jours après l'infection, on constate une forte surexpression de ces mêmes gènes, ce qui est cohérent avec l'enrichissement en termes GO d'oxydo-reduction à 48h pour Caturra (**Fig. 29A**).

C'est le cas par exemple du gène Cc05_g09930, qui code pour une Chlorophyll a-b binding protein 8, chloroplastique (CAB8). Ce gène (équivalent à AT1G61520 chez *Arabidopsis*) a été reporté 72 heures après l'infection par *Alternaria brassicicola* (un champignon nécrotrophe) de *Arabidopsis thaliana* dans une banque soustractive (Mukherjee *et al.*, 2009).

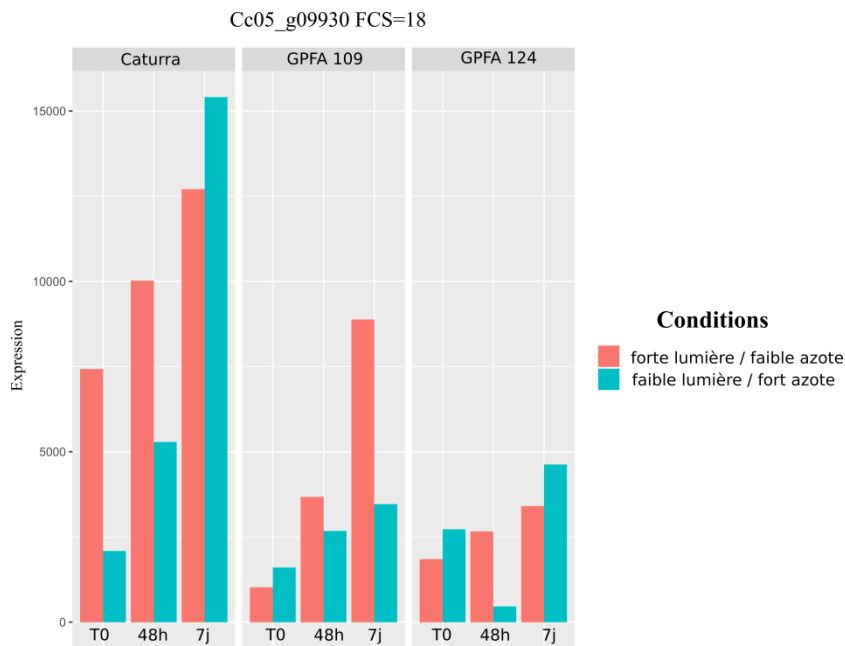


Fig. 30: Expression du gène Cc05_g09930 au cours de la cinétique pour 3 génotypes et deux environnements. FCS : Score de Fisher.

Dans nos conditions expérimentales, le niveau d'expression de ce gène est plus élevé à T0 chez le Caturra que chez les hybrides (Fig. 30). L'infection par la rouille est corrélée à une augmentation des niveaux d'expression chez les trois génotypes dans les deux conditions environnementales. L'expression est maximale 7 jours après infection. Les écarts entre le Caturra et les deux hybrides sont maintenus. L'expression varie aussi en fonction des stress abiotiques, le plus fortement chez Caturra et le plus faiblement chez l'hybride le plus résistant (GPFA124). Nous supposons que ce gène est exprimé lorsque les stress augmentent (biotiques et abiotiques). Ce gène ne semble pas être uniquement une réponse à l'infection par la rouille mais c'est sans doute un bon indicateur des stress du photosystème et par extension de l'état de santé de la plante.

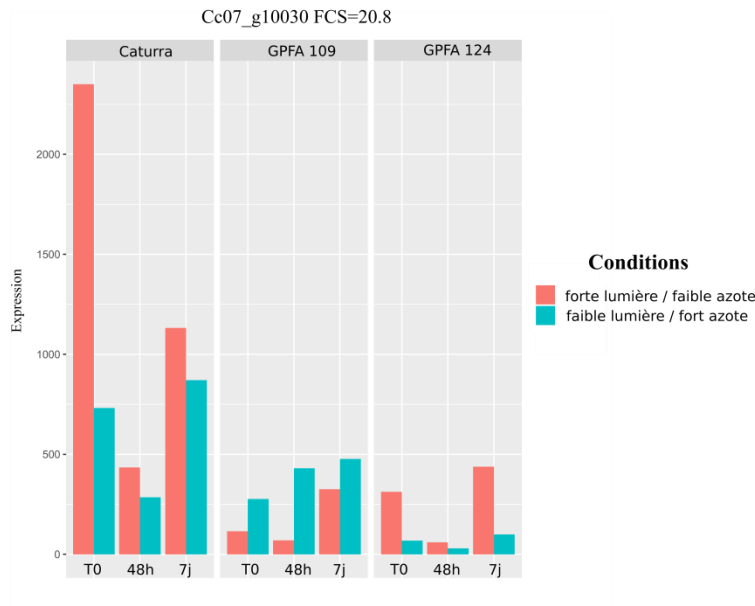


Fig. 31: Expression du gène Cc07_g10030 au cours de la cinétique pour 3 génotypes et deux environnements. FCS : Score de Fisher.

Il existe également des gènes qui ne font pas partie du photosystème et dont le niveau à T0 chez Caturra est significativement supérieur à celui des hybrides. C'est le cas de Cc07_g10030 (**Fig. 31**) qui code pour une Dehydrin DH1a. Ces protéines jouent un rôle fondamental dans la réponse des plantes et l'adaptation aux stress abiotiques (<http://www.plantcell.org/content/26/7/3148>). Elles s'accumulent dans les feuilles après des stress dus au froid, à la salinité et à la déshydratation. Nous observons que l'expression du gène est très forte chez la lignée homozygote Caturra au temps T0. On peut donc considérer ce gène comme un bon marqueur de la 'mauvaise santé' constitutive de la plante avant infection. Après infection, l'expression diminue fortement à 48 h puis augmente de nouveau à 7 jours.

En revanche les gènes surexprimés chez les hybrides sont tous des gènes faiblement exprimés à T0 mais dont l'expression augmente très largement dans l'environnement 'forte lumière/faible azote' et/ou dans 'faible lumière/fort azote'. Il est donc fort probable que l'expression de ces gènes est déclenchée en réponse à l'infection (PTI). La grande majorité de ces gènes lorsque nous avons pu connaître leur fonction, est impliquée dans des mécanismes de défense liés aux stress biotiques et /ou abiotiques. Six sont liés à la voie du jasmonate, huit à celle de l'ABA, un à la voie de l'acide salicylique, trois sont directement liés à des éliciteurs fongiques et trois autres qui sont déclenchés par les ROS.

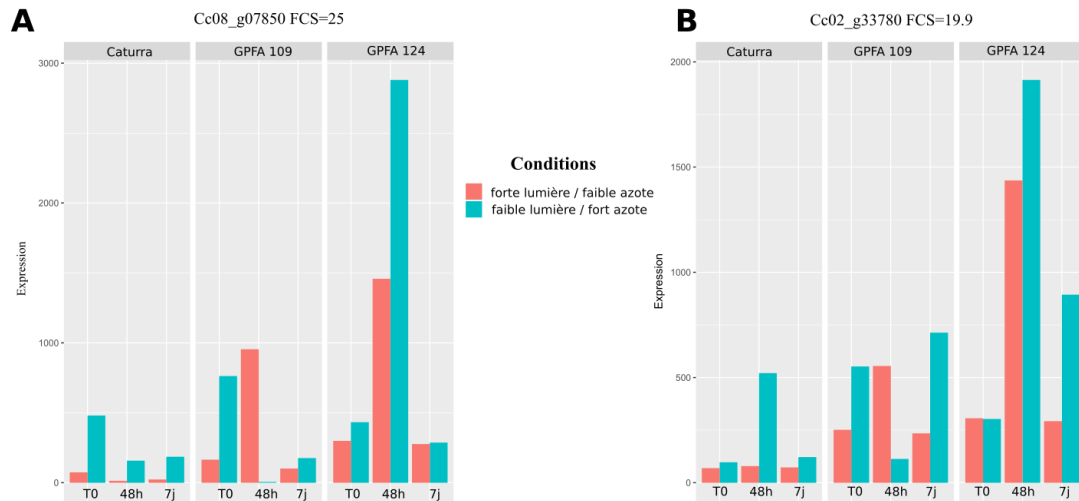


Fig. 32: Expression des gènes Cc08_g07850 et Cc02_g33780 au cours de la cinétique pour 3 géotypes et deux environnements. FCS : Score de Fisher.

Le gène Cc08_g07850 qui code le facteur de transcription *WRKY40* présente un comportement représentatif des gènes surexprimés chez les hybrides.

Chez l'hybride le plus résistant, le gène qui code pour *WRKY40* est fortement surexprimé à 48 h dans les deux environnements testés (**Fig. 32A**), ce qui n'est pas le cas pour la lignée Caturra. Chez l'hybride qui présente une quantité de rouille intermédiaire, cette sur-expression à 48h est mesurée mais elle est beaucoup plus faible que celle observée chez l'hybride le plus résistant.

Le facteur de transcription *WRKY40* est théoriquement capable de se lier à plus de 1400 gènes (au moins par l'intermédiaire d'une W-box) dans leur zone promotrice afin de moduler leur transcription. La plupart des gènes ciblés par *WRKY40* sont impliqués dans des voies de perception du signal et de transduction pendant l'attaque de microbes (MAMPs) ou de dégâts (DAMPs) causés par des stress abiotiques ou biotiques. Ce gène est fortement impliqué dans les réponses de défenses aux pathogènes et notamment aux champignons chez *Arabidopsis*. Il est finement régulé par l'ABA. *WRKY 40* est associé à la voie de signalisation appelée MAMPs (microbe associated molecular patterns) qui grâce à des récepteurs de reconnaissance localisés dans les membranes plasmiques (PRRs) initient une signalisation intracellulaire rapide qui aboutit à un déclenchement de l'immunité (appelée MTI, pour MAMP-triggered immunity). Pendant le MTI, plus d'une quinzaine de gènes *WRKY* sont induits et notamment les facteurs de transcription *WRKY18* et *WRKY40*. Ces deux FTs agissent ensemble en régulant négativement la résistance du parasite obligatoire hemibiotrophic *Golovinomyces*

orontii (Pandey *et al.*, 2010). Chez le caféier ces deux gènes sont exprimés dans les feuilles mais n'ont pas été activés par la rouille, des blessures, la maturation du fruit ou la sénescence dans une étude de Ramiro *et al.* (2010). Le gène *WRKY40* est aussi impliqué dans le compromis croissance/défense et peut être régulé négativement, notamment par les brassinostéroïdes.

Le gène Cc02_g33780 code pour une lipoxygénase (*LOX3*). *LOX3* est une cible directe de *WRKY40* (**Fig. 32B**). *LOX3* catalyse la production d'acide jasmonique (inducteur notamment d'inhibiteurs de protéases et de phytoalexines). L'oxygénation des acides gras polyinsaturés par les lipoxygénase (*LOX*) est le premier pas dans la formation d'une famille de médiateurs lipidiques (Schneider *et al.*, Chemistry and Biology review, 2007). Ces médiateurs sont induits par une grande variété de stress abiotiques et biotiques et sont impliqués dans la voie de signalisation du jasmonate. Les *LOX* sont considérés comme essentielles pour la résistance du tabac à l'infection par les champignons. D'autres gènes sont la cible de *WRKY40*, à l'image de gènes qui codent pour des transporteurs (exemple Cc10_g12380 ABC transporter C family).

4.4.4 Conclusions et perspectives

Les gènes surexprimés chez la lignée homozygote Caturra indiquent un état qui peut être assimilé à des réponses des plantes à un stress oxydatif préalable à l'infection et induit par les conditions environnementales. En se référant au concept de santé de la plante on pourrait considérer que le Caturra présente un 'terrain' favorable à l'infection. L'infection par le parasite ne fait qu'aggraver l'expression de ces gènes liés aux stress. Ces résultats rejoignent ceux du chapitre 1 dans lequel nous avons montré que le flux d'électrons était moins efficace chez l'homozygote en conditions environnementales défavorables.

Au contraire, l'absence de 'pré-disposition' chez les hybrides laisse supposer un état non stressé. De ce fait les hybrides répondent à l'infection en déployant des défenses plus nombreuses, plus variées et plus efficaces. Le type de défense déployé par les hybrides est souvent cohérent avec les données de la littérature. Il reste surprenant toutefois que la plupart des gènes identifiés soient impliqués dans les voies de l'ABA et du Jasmonate. En effet, le Jasmonate est plutôt impliqué dans les réponses aux pathogènes de type nécrotrophes.

L'analyse des banques RNAseq collectées à 24 heures nous permettra sans doute d'affiner notre liste de gènes candidats et de mieux comprendre les mécanismes en jeu.

D'ores et déjà, le rôle pivot de *WRKY40* doit être souligné car il s'agit d'un gène clé dans les mécanismes de régulation du compromis entre croissance et défense contre un pathogène (**Fig. 2**) qui cible plusieurs centaines de gènes en cascades (Box W) dont les gènes Lox.

Une recherche d'indice de facteurs de régulation dans les zones promotrices des gènes candidats doit d'ailleurs être entreprise, non seulement pour *WRK40* mais aussi pour le Jasmonate et l'ABA.

La méthodologie que nous avons appliquée nous a permis de sélectionner un nombre raisonnable de gènes, dont la fonction est souvent reliée à des défenses de la plante. Notre méthodologie nous semble donc adaptée à la question posée.

Cette première approche transcriptomique nous permet de répondre à notre hypothèse de départ. C'est bien l'état de stress du Caturra qui l'empêche de répondre efficacement au pathogène. Au contraire la réponse de l'hybride est meilleure parce qu'il est beaucoup moins stressé et qu'il met en place une réponse plus ciblée et plus massive. Il n'existe sans doute pas de gènes spécifiques de défense pour des plantes sensibles. Par contre, le rôle pivot de *WRKY40* doit être examiné et il faudra rechercher des gènes liés au compromis croissance/résistance dont l'expression pourrait être significative à 24 heures.

On peut émettre plusieurs hypothèses non contradictoires pour expliquer la mise en place des réactions de défenses des hybrides de manière plus forte.

4.4.4.1 L'état hétérozygote des hybrides permet une meilleure reconnaissance du pathogène.

Le point de départ d'une résistance est la reconnaissance par un récepteur d'un motif ou d'une molécule microbiens (dit "éliciteur"). Il y a alors trois cas de figures : (i) le récepteur est parfaitement adapté à l'éliciteur et il déclenche une cascade d'événements aboutissant à des réactions de défense rapides et fortes (ii) le récepteur est mal adapté à l'éliciteur. Il déclenche ainsi les défenses mais trop tard et trop faiblement (iii) s'il n'y a pas de récepteur ou s'il n'y a pas d'éliciteur, rien ne se déclenche, le pathogène peut entièrement dérouler son cycle. Ainsi, si un hybride contient deux allèles non-adaptés, les défenses ne sont pas déclenchées plus rapidement mais l'effet quantitatif des deux récepteurs s'additionne pour être plus fort que chez l'homozygote. Cette hypothèse s'applique dans le cas d'une attaque par une seule souche de rouille.

4.4.4.2 L'état hétérozygote des hybrides permet de détecter une plus grande proportion de la population de rouille.

L'inoculum utilisé est un mélange de plusieurs races de rouilles représentatives de celles retrouvées sur le terrain. On pourrait supposer que chacun des parents possède des récepteurs mal adaptés à seulement une partie de la population. Ainsi, comme l'hybride possède les deux allèles (ou les deux gènes s'il s'agit de gènes différents), il déclenche pour une plus large portion de la population de rouille une défense plus faible (cf (ii)). La somme de ces défenses conduit à une réponse plus forte.

4.4.4.3 L'état de santé préalable à l'infection est un déterminant majeur de la mise en place des défenses basales.

Cette hypothèse ne contredit pas les deux précédentes mais c'est elle qui nous semble la plus vraisemblable pour expliquer ce que nous constatons chez le Caturra en conditions de fort stress abiotique.

Chez cette variété, le mauvais fonctionnement général de la plante induit par une forte lumière et une faible quantité d'N, limite fortement l'intensité de sa réponse au pathogène. La défense basale est trop faible et/ou trop lente. L'analyse approfondie du Caturra dans les quatre conditions environnementales nous permettra de distinguer exhaustivement les gènes de réponse aux stress préalables à l'infection, de ceux dont l'expression a varié en réponse au pathogène. C'est à dire que nous pourrions comprendre si les stress ont surtout limité la reconnaissance du pathogène ou si les stress ont surtout joué sur la capacité à mettre en place des défenses. Mais comment expliquer cette moindre capacité du Caturra liée à l'environnement?

« Ce qui anime la vie, c'est un peu de courant électrique, entretenu par le soleil » a déclaré A. Szent-Gyorgyi prix Nobel de physiologie en 1960. La photosynthèse dans les chloroplastes implique un transport d'électrons, impliquant des différences de potentiel redox (Eh) et de pH des deux côtés de la membrane (lumière et stroma) pour les thylakoïdes, mais aussi entre différentes zones de la surface de la membrane (Lambers *et al.*, 2009). Des processus similaires ont lieu dans le cycle de Krebs dans les mitochondries. La compartimentation et le bon équilibre du potentiel redox sont essentiels non seulement pour établir la cinétique de transfert des électrons, mais aussi pour conserver l'énergie inhérente aux gradients potentiels associés aux voies de transport des électrons (Chang et Swenson, 1997). Par ailleurs, la détection redox chloroplastique affecte l'expression des gènes chloroplastiques et nucléaires

en réponse, non seulement à l'intensité lumineuse, mais aussi à une multitude de stress (Baier, Ströher and Dietz, 2004; Wilson *et al.*, 2006; Kangasjärvi *et al.*, 2012).

Les études sur l'impact du potentiel redox (Eh) sur les agents pathogènes des plantes sont peu nombreuses mais indiquent que le développement de plusieurs pathogènes des plantes pourrait être lié à un Eh élevé. Deux exemples illustrent cette hypothèse. La différenciation sclérotique des champignons phytopathogènes tels que *Rhizoctonia solani* est induite par le stress oxydatif (Patsoukis et Georgiou, 2007). Les engrais azotés appliqués sous forme de NO₃ (forme oxydée de N) déclenchent de graves attaques de pyriculariose du riz, alors que l'application sous forme de NH₄⁺ (forme réduite de N) ne l'induit pas (Osuna-Canizalez, De Datta et Bonman, 1991).

Nous pensons que la modification de l'état redox global du Caturra en réponse aux stress abiotiques diminue sa capacité à répondre à l'infection de la rouille. A contrario, l'hybride dont l'état redox n'a pas été modifié par les stress abiotiques est en capacité de mettre en place des défenses basales qui limitent l'infection du pathogène. En conséquence il faut rechercher pourquoi l'hybride résiste mieux aux stress abiotiques avant infection.

4.4.4.4 Comment expliquer les plus grandes capacités de l'hybride à faire face aux stress abiotiques ?

En comparant l'Arabica allopolyploïde à ses deux parents, Bertrand *et al.* (2015) ont conclu que les gènes liés à l'activité redox ont montré une plus grande homéostasie chez l'allopolyploïde que chez les parents diploïdes. Coate *et al.* (2013) ont montré sous un excès de lumière permanente, que les mécanismes de photoprotection étaient plus efficaces chez un allopolyploïde naturel (*Glycine dolichocarpa*) récemment formé que chez ses parents diploïdes (*G. tomentella* et *G. syndetika*). Dans le cas de l'allopolyploïde l'hypothèse veut que ce soit l'hétérozygotie fixée par les deux sous-génomes qui est en mesure d'expliquer que les senseurs membranaires agissent plus vite et plus efficacement pour corriger les stress environnementaux. Nous formulons la même hypothèse pour expliquer la supériorité de l'hybride. C'est l'état hétérozygote des hybrides qui leur permet de détecter les stress abiotiques et de mieux se préserver du fait d'une plus grande homéostasie membranaire, et qui en conséquence leur permet ensuite, puisqu'ils sont en meilleure santé de mieux lutter contre la maladie.

Osons donc compléter la phrase de Szent-Gyorgyi : ‘ Chez les plantes ce qui anime la vie, c'est un peu de courant électrique, entretenu par le soleil, dont les photons passent par des membranes dont l'homéostasie dépend du polymorphisme de leurs récepteurs’.

4.4.5 Annexes

Table S1: Comparaison de l'alignement de 45 échantillons RNAseq séquencés en Single Read 50 (SR50) et en Single Read 100 (SR100)

Echantillon	Type	% de reads alignés de manière unique	% de reads alignés de manière non ambiguë	% de reads alignés à plusieurs positions
1	SR100	85,51	65,1	4,1
1	SR50	84,32	63,6	5,7
2	SR100	87,43	67,23	3,8
2	SR50	86,07	65,55	5,5
3	SR100	83,17	54,13	8,5
3	SR50	80,87	52,42	10,5
7	SR100	80,93	62,85	5,3
7	SR50	79,24	60,98	7,3
8	SR100	86,77	68,82	4
8	SR50	85,12	66,97	6
9	SR100	84,46	62,38	4,1
9	SR50	82,36	60,03	6,7
19	SR100	87,84	69,13	3,6
19	SR50	85,95	66,86	5,9
20	SR100	88,52	68,98	3,5
20	SR50	86,8	66,88	5,8
21	SR100	85,03	61,2	5,5
21	SR50	82,74	59,33	7,8
25	SR100	87,06	70,4	3,7
25	SR50	84,94	67,96	5,9
26	SR100	85,22	66,73	3,4
26	SR50	83,3	64,5	5,5
27	SR100	86,84	68,27	3,7
27	SR50	84,9	65,92	5,9
37	SR100	80,76	62,96	3,7
37	SR50	78,7	60,7	6,3
38	SR100	85,5	60,43	5,6
38	SR50	83,48	58,61	7,5
39	SR100	86,4	66,92	3,9
39	SR50	84,14	64,51	6,3
43	SR100	86,04	63,78	4,8
43	SR50	84,81	62,28	6,4
44	SR100	85,09	63,69	4,1
44	SR50	83,81	62,15	5,7
45	SR100	81,41	58,38	6,3
45	SR50	79,97	56,88	8

Partie 5. Discussion

La santé des plantes, et notamment la santé des plantes en agriculture, représente un enjeu majeur pour l'humanité. C'est à partir de plantes en Bonne Santé que l'humanité pourra faire face à ses besoins en nourriture, biofuel, médecine, etc... Nous pensons même qu'il devrait s'agir d'un Bien Public car cela renvoie à un intérêt commun, au même titre que la qualité de l'eau ou de l'air. La vie sur terre est directement dépendante des végétaux, et l'homme par ses activités à grande échelle menace cet équilibre. S'agissant de l'agriculture il faut réinventer nos modes de production et notamment éviter l'utilisation massive de pesticides qui ont un impact négatif sur la biodiversité et les équilibres écologiques (E. Birch, Begg et Squire, 2011; Popp, Peto et Nagy, 2013).

Nos travaux visent à substituer à l'équation classique « variétés sensibles et parapluie phytosanitaire » qui est la base d'une agriculture intensive, l'équation « variétés résistantes et adaptées + fertilisants naturels + Bonne Santé de la plante » tout en maintenant un objectif de rendement équivalent, ou *a minima* un niveau de pertes économiquement acceptables.

Notre modèle d'étude est le caféier Arabica. Il s'agit d'une espèce de grande importance économique et particulièrement menacée par les enjeux liés au changement climatique et aux grandes épidémies de rouille orangée que celui-ci amplifie (Baca *et al.*, 2014; Avelino *et al.*, 2015; Bunn *et al.*, 2015). Pour étudier l'impact de la santé de la plante sur l'incidence de la rouille orangée chez l'Arabica, nous avons en conditions artificielles, soumis des variétés de café (représentés par des plantes en phase juvénile) à des environnements thermiques et agronomiques censés mimer des conditions plus ou moins stressantes rencontrées au champ en milieu réel et nous avons ensuite observé l'évolution d'un pathogène jusqu'à sa fructification.

Cette réduction de la réalité engendre un certain nombre de biais que nous soulignerons au cours de cette discussion et ne peut pas rendre compte de la complexité des situations au champ, où les plantes pérennes sont soumises à une succession de stress, année après année (Mittler et Blumwald, 2010a; Atkinson et Urwin, 2012). Notamment les stress engendrés par la forte production ne sont pas pris en compte. Il faut souligner toutefois que parallèlement à notre thèse, une autre thèse est menée sur le terrain pour tester des hypothèses assez proches (F. Echeverria, thèse de doctorat de T&M Univ.). Nous avons la satisfaction de noter qu'une grande partie de nos résultats sont corroborés par ce (Echeverria-beirute *et al.*, 2017) et nous y reviendrons au cours de cette discussion.

5.1 Quel rôle joue l'environnement et les pratiques agricoles sur l'infection et la capacité de réponse de la plante ?

Comme nous l'avons vu en introduction, les stress thermiques ont un impact fort sur la physiologie des plantes (Prasch et Sonnewald, 2015). Afin de comparer des conditions de culture normales à ce qu'elles risquent de devenir dans un futur proche, les plantes ont été soumises à deux régimes thermiques afin de déterminer l'impact de la température sur le développement de l'infection par le champignon. Un différentiel de 4 à 5°C entre les deux régimes thermiques s'est révélé avoir un effet drastique sur le développement du champignon en étant toutefois bien moins préjudiciable pour les hybrides que pour la variété lignée.

Le caféier est une plante ombrophile qui peut se cultiver sous ombrage ce qui permet d'établir des systèmes agroforestiers à base de caféiers. Le rôle de l'ombrage naturel sur le développement des maladies a été étudié et a montré qu'il affecte plusieurs paramètres environnementaux, avec des effets antagonistes aussi bien pour le pathogène que pour la plante. Le couvert végétal va affecter des paramètres physiques comme la température, les radiations solaires, l'humidité de l'air et du sol, le vent, la pluie, mais aussi le développement et la physiologie de la plante (anatomie des feuilles, nombre de stomates, ouverture stomatique, charge en fruit,...) (Avelino, Willocquet et Savary, 2004). Enfin, il ne faut pas oublier la forte hétérogénéité de la plupart des systèmes agroforestiers. López-Bravo, Virginio-Filho et Avelino (2012) ont montré que l'ombrage augmentait la sévérité de la rouille. Ils pensent que le microclimat sous ombrage est plus favorable du fait de moindres écarts de températures et d'une plus grande humidité. Nos résultats ont montré que l'infestation était beaucoup plus forte (plus précoce et plus intense) chez les plantes cultivées avec une forte intensité lumineuse. Nous n'avons donc pas retrouvé les résultats de ces auteurs. Cela provient sans doute du fait que dans nos conditions la température et l'humidité étant bien régulées elles étaient les mêmes dans les deux conditions d'ombrage et de lumière.

Enfin, la nutrition minérale joue un rôle essentiel sur la santé de la plante. Les variations des cours du café ont souvent pour conséquence d'entraîner une baisse de la fertilisation, notamment azoté, par manque de moyen de la part des producteurs (Avelino *et al.*, 2015). Le lien entre fertilisation azoté et les épidémies de rouille orangée est maintenant bien établi, ce que nous avons aussi pu vérifier dans nos conditions expérimentales.

Les expérimentations à la base de ce travail de thèse ont pu clairement montrer l'impact de l'environnement sur l'infection par la rouille orangée. Nos résultats ont aussi permis de

mesurer l'influence de ces paramètres de culture sur la relation hôte-pathogène. Comme attendu, le stress thermique a l'impact le plus fort sur l'infestation, suivi par l'intensité lumineuse pour finir par la nutrition azoté.

5.2 Quelle est la capacité du caféier à croître sous des conditions de stress multiples incluant la rouille orangée ?

La combinaison de stress abiotiques mise en œuvre au cours de cette étude, en conditions contrôlées, sur de jeunes plants de caféiers, a permis de montrer l'impact fort de la température, de l'intensité lumineuse et de la nutrition azotée sur le développement de la maladie. La comparaison d'une variété lignée sensible très largement cultivée, - Caturra-, et de deux hybrides, -également sensibles à la rouille orangée-, a également permis de démontrer l'importance de la composante génétique dans la capacité de la plante à faire face à l'attaque du pathogène en fonction de conditions environnementales plus ou moins défavorables. Les hybrides se sont révélés, à l'image de ce qui peut être mesuré au champ, beaucoup plus homéostables que la variété lignée. En d'autres termes, ils sont en meilleure santé, même dans des environnements stressants, ce qui leur confère une plus grande aptitude à résister à l'attaque d'un pathogène. Ici le terme 'santé' se réfère à la définition suivante : une plante est en bonne santé aussi longtemps que ses performances physiologiques conditionnées par son potentiel génétique et les conditions environnementales, sont maintenues (Döring *et al.*, 2012). Sous des conditions de stress abiotiques multiples, nous avons montré l'importance de l'homéostasie physiologique de plantes soumises à l'attaque d'un pathogène. Or l'homéostasie est une des composantes majeures et bien connues de l'hétérosis chez les plantes améliorées et chez l'Arabica en particulier (Bertrand *et al.*, 2011). L'utilisation d'hybrides F1, obtenus par croisement entre parents sensibles, mais sélectionnés pour leur vigueur par rapport à leurs parents, se confirme donc comme une piste prometteuse pour lutter contre la rouille orangée au champ à condition de suivre les bons itinéraires techniques.

L'étude menée par Echeverria-beirute *et al.* (2017) en conditions de champ montre au cours d'une épidémie de rouille, que la sporulation a été réduite significativement chez l'hybride (var. H3) par rapport à la variété lignée Catuai (l'équivalent de Caturra) pour l'incidence de la maladie (nombre de feuilles affectées) et pour la sporulation de rouille (quantité de spores). Il observe en fin d'épidémie que la chute des feuilles est retardée d'un mois chez l'hybride. Lorsque la production est réduite par éclaircissage, l'incidence et la sporulation diminuent chez l'hybride comme chez la lignée. Nos résultats obtenus en conditions contrôlées avec un mélange de races de rouille, vont dans le même sens que ceux d'Echeverria obtenus avec la rouille rencontrée au champ.

L'une des conclusions majeures de notre travail et de celui d'Echeverria est que les stress dus à l'environnement augmentent l'incidence de la rouille et qu'une bonne santé de la plante la diminue au contraire et cela indépendamment des races de rouille. Cette bonne santé de la plante est la résultante à la fois des conditions environnementales mais aussi de la vigueur hybride. Cependant comme nous l'avons souligné dans notre introduction, la 'bonne santé' de la plante est un concept utile mais non suffisant si l'on ne l'approche pas par des indicateurs de la santé. Ces indicateurs sont indispensables pour mesurer un état de santé.

Plusieurs pistes ont été explorées afin de caractériser l'état de santé des plantes et éventuellement trouver des marqueurs de cet état. Mesurer cet état de santé au moment de l'infection en fonction de conditions de culture plus ou moins stressantes s'est révélé assez ardu. L'analyse, aussi bien du métabolisme primaire que secondaire ou encore de l'ABA a produit des résultats globalement décevants, même si le rapport C:NH₄ est apparu comme un marqueur potentiellement intéressant. Sa mesure reste toutefois onéreuse et nécessite l'appui d'un laboratoire d'analyse. Il est toujours possible d'imputer ces résultats à l'effectif de plantes, au design expérimental ou même aux installations techniques utilisées, mais il semble plutôt qu'aucune de ces pistes ne pourra donner un indicateur global de la santé de la plante. En revanche, la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a*, en nous donnant accès au fonctionnement du PSII et de la chaîne de transport d'électrons, s'est révélée un excellent marqueur de l'état de santé des plantes capable de prédire la capacité de la plante à résister à l'infection par le pathogène. C'est, à notre connaissance, la première fois que cette technologie, simple, rapide et peu coûteuse, est utilisée pour prédire l'état de santé d'une plante. Sur la base de nos résultats, il est d'ailleurs envisagé d'utiliser cette technologie prédictive directement au champ afin de valider son potentiel. Les variétés hybrides, en condition de stress abiotiques multiples, ont la capacité de maintenir leur efficacité photosynthétique à un niveau très supérieur à celui de la variété Caturra, et probablement leur taux de ROS à un niveau faible, ce qui peut expliquer, au moins en partie, la vigueur hybride. Les plantes présentent des niveaux de résistance aux stress proportionnels à la quantité d'énergie dont elles vont disposer pour y faire face. Il est donc logique que les hybrides présentent une meilleure résistance aux stress. Par manque de matériel végétal, le stress oxydatif n'a pas été mesuré alors qu'il pourrait lui aussi se révéler un bon marqueur de l'état de santé de la plante (Kangasjärvi *et al.*, 2012; Choudhury *et al.*, 2017).

Nous avons réussi avec succès à combiner trois stress abiotiques et un stress biotique en conditions contrôlées afin de s'approcher des conditions de culture des caféiers et nous avons identifié un indicateur fiable, simple à mettre en œuvre au champ et très peu coûteux pour

mesurer l'état de santé. Nous pensons qu'il devient envisageable de s'atteler à des études plus complexes qui mimeront davantage les conditions réelles. En effet, puisque le caféier subit un stress hydrique, thermique, et lumineux (culture en plein soleil) avant la saison des pluies et l'arrivée des stress biotiques comme la rouille orangée, il serait possible d'envisager une séquence de stress correspondant à celle rencontrée actuellement par les caféiers et la même séquence telle qu'on l'envisage dans 30 ans (Baca *et al.*, 2014; Bunn *et al.*, 2015). Les plantes seraient alors soumises à un stress hydrique contrôlé, puis après un temps de récupération, elles seraient infestées par la rouille orangée. Ceci se ferait sous deux régimes thermiques et deux concentrations en CO₂ (actuelle et future) avec une intensité lumineuse forte ou faible (plein champ *vs* agroforesterie) et deux niveaux de fertilisation azotée (faible et forte). Lors de cette nouvelle étude, le matériel végétal serait constitué de variétés hybrides et de leurs parents, ce qui nous a fait défaut lors de cette première étude pour établir l'hétérosis par rapport aux parents.

5.3 Quelle est la relation entre la vigueur hybride, l'efficacité photosynthétique et plus généralement le métabolisme énergétique ?

La littérature fournie un début de réponse à cette question. L'altération des régulateurs principaux de l'horloge circadienne a un impact positif sur la biosynthèse de chlorophylle et la production de sucres (saccharose et amidon), ce qui explique l'excédent de biomasse attribuable à la vigueur hybride (Ni *et al.*, 2009). Ces résultats ayant été obtenus lors de l'étude d'hybrides d'*Arabidopsis* ou de riz, nous avons voulu vérifier s'ils étaient généralisables, notamment à une plante pérenne, et aller plus loin dans l'analyse afin de mieux décrire cet aspect de la vigueur hybride, à la fois sous un angle physiologique, mais aussi génétique. Nous avons donc entrepris d'analyser en conditions contrôlées, en absence de stress, deux génotypes (Hybride vs lignée) en utilisant les techniques de RT-QPCR, de RNAseq, de mesure de la fluorescence de la chl *a*, de dosage de chlorophylle et de sucres. Cette étude a permis de montrer une altération de l'expression des gènes centraux de l'horloge circadienne chez les hybrides et ses conséquences positives sur la photosynthèse et le métabolisme primaire. Il reste toutefois des pistes d'étude très intéressantes à poursuivre sur la base de ces premiers résultats. Il est bien connu qu'un excès d'énergie reçu par la feuille entraîne la production d'un excès d'électrons qui se traduit par la production de ROS qui modifie le potentiel redox et l'intégrité des membranes. Le flux cyclique d'électrons plus important chez l'hybride limite ce stress oxydatif. Dans l'optique de mieux comprendre le rôle du stress oxydatif dans nos variétés, sa gestion par la plante et son incidence sur sa santé, l'étude de l'expression des gènes liés à ce stress (polyphénol oxydase, catalase, peroxydase, thiol réductase, ...), révélée par les RNAseq, -réalisés en condition de stress et hors stress-, devrait nous permettre de mieux comprendre son rôle (protection, signalisation, ...) et l'impact des ROS sur le métabolisme cellulaire.

Nous avons confirmé chez le caféier les résultats de la littérature et établi une corrélation entre l'altération du rythme circadien et le métabolisme primaire. Cependant nous n'avons pas identifié les facteurs de transcription qui font le lien entre ceux de l'horloge circadienne et les gènes directement liés à la photosynthèse et au métabolisme des sucres, ce qui peut toutefois être envisagé en utilisant les résultats de ce travail de thèse.

5.4 Comment identifier des gènes candidats de la bonne santé et/ou de la résistance basale?

Une étude transcriptomique des différents génotypes, au cours de l'infection, a été réalisée afin de pouvoir comparer les profils d'expression des gènes au cours du temps, en fonction des conditions de culture. La quantité de bibliothèques à traiter (96) pose de nombreux problèmes méthodologiques. En effet, seules des comparaisons binaires sont théoriquement possibles pour détecter des gènes différentiellement exprimés. Notre dispositif expérimental utilisé pour identifier des 'gènes candidats' est trop complexe pour être traité uniquement sous forme binaire. Nous avons donc opté pour une approche dans laquelle le niveau d'expression des gènes est corrélé à la quantité de spores de rouille mesurée à la fin du cycle infectieux. Malheureusement en débutant l'étude, nous n'avions pas prévu de garder une traçabilité parfaite entre chaque plante et chaque prélèvement de tissus dont nous avons extrait les ARN. Nous avions prévu trois échantillons d'ARN par traitement, chacun étant prélevé sur une plante sans garder l'information de la plante et de ses performances. Ce faisant notre pouvoir de résolution (= nombre de degrés de liberté lors de la corrélation) était trop réduit (7 ddl pour 8 traitements). Pour surmonter cette difficulté nous avons conçu un indicateur indirect qui est fonction de la quantité de 'reads' non attribué au génome du café lors du 'mapping' sur le transcriptome. En utilisant l'indicateur de rouille le pouvoir de résolution augmente considérablement (23 ddl). Cet indicateur indirect est encore améliorable en alignant les reads des différents RNAseq sur le génome de la rouille (Cristancho *et al.*, 2014). Mais nous n'en disposons pas lors de notre travail.

Une fois la corrélation établie, deux algorithmes ont été développés en se basant sur l'utilisation d'un « Score de Fisher » pour classer les gènes sur la base de plusieurs critères. Le Score de Fisher est une méthode non paramétrique qui ne fait aucune hypothèse sur la distribution des données. Cette approche est particulièrement adaptée aux données générées par les RNAseq qui suivent une loi binomiale négative.

Nous avons appliqué cette méthode afin de mieux comprendre pourquoi la variété Caturra était plus sensible que les deux hybrides. Rappelons que nous avons réalisé des RNAseq en cinétique (T0-T24h-T48h- et T7J) à partir des plants de Caturra cultivés dans nos quatre environnements et deux hybrides dans deux environnements. L'analyse a porté sur la réponse à 48 heures et à 7 jours. Elle pourra être étendue à 24 heures.

En utilisant un seuil de sélection stringent, nous avons sélectionné 1,5 % de gènes ayant le plus grand Score de Fisher. La classification hiérarchique de ces gènes a permis d'identifier des groupes de gènes s'exprimant de la même manière pour le traitement le plus stressant à savoir forte lumière et faible azote. 185 gènes appelés 'gènes candidats' ont été sélectionnés en suivant cette procédure. Les gènes candidats sélectionnés par l'algorithme 1 et qui correspondent à la réponse à 48H après infection ont été subdivisés en 6 groupes de gènes et ceux identifiés par l'algorithme 2 (7 J après infection) en cinq groupes. La méthodologie que nous avons adoptée n'a pas été notre rapportée par d'autres auteurs. Nous pensons qu'il s'agit d'une méthodologie originale qui mérite de faire l'objet d'une publication spécifique à condition de montrer son utilité pour d'autres types de sélection de gènes candidats que ceux liés à la réponse à un pathogène.

5.5 Comment interpréter la meilleure performance des hybrides par l'expression des gènes candidats liés à la réponse aux stress ?

Le point de départ de l'activation d'un mécanisme de résistance passe par la reconnaissance par un récepteur d'un motif ou d'une molécule microbiens ou d'un produit de dégradation des cellules végétales lié à la présence du pathogène. Si le récepteur est parfaitement adapté à l'éliciteur il déclenche une cascade d'événements aboutissant à des réactions de défense rapides et fortes. Si le récepteur est mal adapté à l'éliciteur il déclenche les défenses mais trop tard et trop faiblement. S'il n'y a pas de récepteur ou s'il n'y a pas d'éliciteur, rien ne se produit et le pathogène peut entièrement dérouler son cycle d'infection. Partant de ce constat, il est possible d'émettre l'hypothèse que la lignée Caturra (homozygote) possède un récepteur (un allèle) mal adapté pour détecter un éliciteur de la rouille orangée et déclencher une réponse de défense basale (non spécifique), alors que l'hybride possède deux récepteurs (deux allèles) mal adaptés pour détecter plus efficacement un éliciteur (synergie), ou deux éliciteurs, conduisant à une réponse de défense plus efficace. Cette théorie, si elle ne peut être exclue par nos résultats, n'est pas suffisante pour expliquer l'homéostasie des hybrides. De même, il serait aussi possible d'émettre l'hypothèse que la population de rouille est génétiquement hétérogène et que Caturra, comme chacun des parents de l'hybride, possède la résistance à seulement une partie de la population. Dans ce cas, l'hybride possède deux allèles (ou 2 gènes s'il s'agit de gènes différents) et peut résister à une plus large portion de la population du pathogène. Cette hypothèse est envisageable car nous avons utilisé lors de notre étude un mélange de souches issues de différentes parcelles et prélevées sur différents génotypes de plantes donc une population a priori génétiquement hétérogène. Toutefois, les différences de fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons des chloroplastes (chapitre 1), la différence d'efficacité photosynthétique (chapitre 2) et les fonctions GO mises en évidence lors de l'analyse des gènes exprimés en réponse à l'attaque du pathogène (chapitre 3) constituent un ensemble de données qui convergent toutes vers l'état redox de la cellule. Bertrand *et al.* (2015) ont démontré qu'il existait peu de différence en terme d'expression des gènes entre un allopolyploïde (*Arabica*) et ses parents diploïdes (*C. canephora* et *C. eugenioides*) en considérant des grandes fonctions comme la photosynthèse, la respiration ou l'horloge circadienne. Par contre, les gènes liés à l'activité redox expliquent l'homéostasie de l'allopolyploïde. Indépendamment des mécanismes éliciteurs-récepteurs

spécifiques des réponses hôtes-pathogènes, il semblerait que le potentiel redox soit un excellent indicateur de l'état de santé de la plante qui puisse expliquer que le pathogène rencontre, ou pas, un terrain favorable pour se développer.

5.6 Comment renforcer l'hypothèse de la meilleure résistance des hybrides par l'état initial de santé de la plante ?

L'hypothèse que nous soutenons va pouvoir être renforcée en analysant les gènes différentiellement exprimés au niveau T0 et corrélés à la réponse à la rouille.

Une analyse transcriptomique de ces RNAseq va révéler, au niveau moléculaire, les réponses apportées par la plante à l'infection en fonction de son état de stress initial. Outre une meilleure compréhension des bases moléculaires de la santé de la plante, il sera probablement possible d'identifier de nouveaux marqueurs de cet état. De plus, ces connaissances seront à même de nous permettre de proposer des modifications des itinéraires techniques de culture afin de réduire les stress, d'augmenter le niveau de santé des plantes cultivées et de réduire l'incidence de la rouille orangée au champ.

5.7 Comprendre les bases moléculaires de la santé de la plante

Les algorithmes développés ayant fait la preuve de leur efficacité, nous prévoyons de les utiliser sur la base d'un autre critère discriminant que l'infestation par la rouille. La mesure de fluorescence de la chlorophylle 'a' étant un bon marqueur du fonctionnement de la photosynthèse, nous allons l'utiliser comme critère discriminant pour identifier les gènes du métabolisme expliquant la meilleure efficacité photosynthétique des hybrides. La lumière agit sur les mécanismes de défense en conditionnant l'état énergétique et redox des cellules, la production des ROS, et les voies de signalisation impliquant les photorécepteurs. Les chloroplastes, qui abritent plusieurs voies métaboliques essentielles (hormones, acides aminés, métabolites secondaires, lipides), sont des senseurs très sensibles de l'environnement (Kangasjärvi *et al.*, 2012). Utiliser les résultats de mesure de fluorescence de la chl a comme critère discriminant nous permettra incontestablement d'identifier des gènes candidats. C'est d'autant plus logique que les chloroplastes sont à la fois le siège de la photosynthèse, de voies métaboliques essentielles (et notamment de biosynthèse d'hormones de stress), et qu'ils agissent aussi comme modulateurs de la réponse immune (Kangasjärvi *et al.*, 2012). Parmi ceux qui seront identifiés sur la base de l'analyse des banques RNAseq réalisées en conditions de stress (chapitre 1) et sans stress (chapitre 2) certains gènes candidats sont susceptibles d'être impliqués dans le compromis croissance-défense et pourront représenter de nouveaux marqueurs de la vigueur hybride situés à l'interface des voies de signalisation liées à la croissance et de celles liées aux mécanismes de défense.

5.8 Utiliser l'environnement comme une source de variation pour identifier des QTT (Quantitative Traits Transcripts) liés à la santé de la plante.

Ces différentes façons d'analyser nos résultats expérimentaux, qui ne sont probablement pas exhaustives, vont nous conduire à identifier des gènes candidats. Comment ensuite valider ces GC. Ces gènes candidats pourront présenter des fonctions connues ou inconnues et se situer à différents niveaux des voies de régulation (circadian clock, regulation module, master or minor regulator, ...). Dans le second cas, et dans une optique de validation fonctionnelle, la technique d'édition des génomes pourrait être utilisée pour générer des mutants « knock out », ou la technique de transformation génétique pour sur-exprimer ces gènes afin de générer des mutants sur-expresssurs et de comprendre leur fonction.

Dans tous les cas, chaque gène candidat pour être retenu comme indicateur de la santé de la plante devra être validé, ce qui va impliquer de définir une taille de population de génotypes et de choisir des environnements et des conditions de stress (unique, multiple, séquentiel) pour y parvenir. Les techniques de RT-QPCR (moins onéreuse et plus ciblée) ou de RNAseq pourront être utilisées pour analyser l'expression de ces gènes candidats.

L'utilisation des variations environnementales pour identifier des QTT a été proposée par Passador-Gurgel *et al.* (2007) dans le cas de la résistance de la drosophile à la nicotine et appliqué par Joët *et al.* (2009) pour déterminer l'accumulation d'acides chlorogéniques dans la graine de caféier. Cette méthode assume que l'environnement est un facteur puissant qui module les niveaux d'expression des gènes et qui de ce fait permet la détection de quantitative trait transcripts (QTTs) reliée au caractère mesuré. Nous pensons que cette approche est particulièrement adaptée à une plante allopolyploïde présentant peu de polymorphisme et nous proposons de l'utiliser pour la sélection de génotypes mieux adaptés aux stress biotiques et abiotiques. Pour une sélection efficace de plantes performantes par QTTs, il faut optimiser les différents termes de l'équation suivante :

$$\frac{\Delta G}{\text{Coût}} = \frac{i h^2 \sigma}{t C t}$$

Avec t = temps, Ct = Coût des tests par unité de temps, σ = variance génétique, h^2 = héritabilité, i = intensité de la sélection (dépend du nombre de génotypes testés), ΔG = gain génétique, Coût = coût du test.

Par exemple pour une maximisation du gain génétique sur PI (index de performance) lié à la fluorescence de la *Chl a*, il faudra s'assurer de son héritabilité notamment dans des dispositifs comparant les hybrides et leurs parents. D'autre part, il faudra s'assurer qu'il existe une grande variabilité (σ) pour ce caractère dans les populations à l'étude. Mais aussi utiliser la mesure au stade juvénile (donc montrer la corrélation avec une mesure à l'état juvénile et sous production), et utiliser des marqueurs précoces et peu coûteux comme par exemple le niveau de l'expression mesuré par la technique qRT-PCR d'un nombre restreint de gènes (QTTs) choisi pour leur corrélation avec le caractère sur lequel porte la sélection.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu montrer le rôle déterminant des conditions environnementales sur la santé de la plante et ses conséquences sur la résistance à un pathogène. Une plante sensible, mais en bonne santé, résistera beaucoup mieux à une infection. L'importance de la photosynthèse dans la définition de la santé de la plante, bien que sans surprise, s'est illustrée aussi bien dans la définition de la vigueur hybride que dans l'identification de marqueurs fonctionnels de la santé du caféier. Enfin, les premières analyses moléculaires semblent indiquer que comprendre la santé d'une plante, c'est avant tout comprendre le compromis croissance / défense.

Partie 6. Bibliographie

Achuo, E. A., Prinsen, E. and Höfte, M. (2006) 'Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*', *Plant pathology*. Wiley Online Library, 55(2), pp. 178–186.

Adams, K. L. (2007) 'Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants', *Journal of heredity*. Oxford University Press, 98(2), pp. 136–141.

Agrios, G. N. (2005) 'Plant Pathology. 5th eds', *Department of Plant Pathology. University of Florida. United States of America*.

Aïnouche, M. L. *et al.* (2009) 'Hybridization, polyploidy and invasion: lessons from *Spartina* (Poaceae)',

Biological invasions. Springer, 11(5), p. 1159.

Alkimim, E. *et al.* (2017) 'Marker-assisted selection provides arabica coffee with genes from other *Coffea* species targeting on multiple resistance to rust and coffee berry disease'. doi: 10.1007/s11032-016-0609-1.

Alves, G. S. C. *et al.* (2017) 'Differential fine-tuning of gene expression regulation in coffee leaves by CcDREB1D promoter haplotypes under water deficit', *Journal of Experimental Botany*, 68(11), pp. 3017–3031. doi: 10.1093/jxb/erx166.

Antonovsky, A. (1996) 'The salutogenic model as a theory to guide health promotion', *Health promotion international*. Oxford University Press, 11(1), pp. 11–18.

Atkinson, N. J., Lilley, C. J. and Urwin, P. E. (2013) 'Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses', *Plant Physiology*. Am Soc Plant Biol, 162(4), pp. 2028–2041.

Atkinson, N. J. and Urwin, P. E. (2012) 'The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field', *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/ers100.

Avelino, J. *et al.* (2006) 'The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations', *Ecological Modelling*, 197(3–4), pp. 431–447. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2006.03.013.

Avelino, J. *et al.* (2015) 'The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions', *Food Security*. doi: 10.1007/s12571-015-0446-9.

Avelino, J., Willocquet, L. and Savary, S. (2004) 'Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics', *Plant pathology*. Wiley Online Library, 53(5), pp. 541–547.

Baca, M. *et al.* (2014) 'An integrated framework for assessing vulnerability to climate change and developing adaptation strategies for coffee growing families in Mesoamerica', *PLoS One*. Public Library of Science, 9(2), p. e88463.

Baier, M., Ströher, E. and Dietz, K.-J. (2004) 'The acceptor availability at photosystem I and ABA control nuclear expression of 2-Cys peroxiredoxin-A in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*. Oxford University Press, 45(8), pp. 997–1006.

Baker, N. R. and Rosenqvist, E. (2004) 'Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: An examination of future possibilities', *Journal of Experimental Botany*, 55(403), pp. 1607–1621. doi: 10.1093/jxb/erh196.

Balfour, E. (1943) *The Living Soil*. Edited by F. and Faber. London, UK.

Ballaré, C. L. (2014) 'Light Regulation of Plant Defense', *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), pp. 335–363. doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040145.

Baranwal, V. K. *et al.* (2012) 'Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour', *Journal of experimental botany*. Oxford University Press UK, 63(18), pp. 6309–6314.

Bardil, A. *et al.* (2011) 'Genomic expression dominance in the natural allopolyploid *Coffea arabica* is massively affected by growth temperature', *New Phytologist*. Wiley Online Library, 192(3), pp. 760–774.

Beans, C. (2017) 'Core Concept: Probing the phytobiome to advance agriculture', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 114(34), pp. 8900–8902.

Bebber, D. P., Castillo, D. and Gurr, S. J. (no date) 'Modelling coffee leaf rust risk in Colombia with climate reanalysis data'. doi: 10.1098/rstb.2015.0458.

Bertrand, B. *et al.* (2011) 'Performance of *Coffea arabica* F1 hybrids in agroforestry and full-sun cropping

systems in comparison with American pure line cultivars', *Euphytica*, 181(2), pp. 147–158. doi: 10.1007/s10681-011-0372-7.

Bertrand, B. *et al.* (2015) 'The greater phenotypic homeostasis of the allopolyploid *Coffea arabica* improved the transcriptional Homeostasis over that of both diploid parents', *Plant and Cell Physiology*. Oxford University Press, 56(10), pp. 2035–2051.

Boorse, C. (1977) 'Health as a theoretical concept', *Philosophy of science*. Philosophy of Science Association, 44(4), pp. 542–573.

Bréhélin, L., Gascuel, O. and Martin, O. (2008) 'Using repeated measurements to validate hierarchical gene clusters', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 24(5), pp. 682–688.

Breitler, J.-C. *et al.* (2016) 'A single-step method for RNA isolation from tropical crops in the field', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 38368. doi: 10.1038/srep38368.

Brochmann, C. *et al.* (2004) 'Polyploidy in arctic plants', *Biological Journal of the Linnean Society*. Oxford University Press, 82(4), pp. 521–536.

Bunn, C. *et al.* (2015) 'Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: An improved understanding of the impacts of climate change', *PLoS ONE*, 10(10). doi: 10.1371/journal.pone.0140490.

Cacas, J.-L. *et al.* (2011) 'Identification and characterization of the Non-race specific Disease Resistance 1 (NDR1) orthologous protein in coffee', *BMC Plant Biology*, 11(1), p. 144. doi: 10.1186/1471-2229-11-144.

Von Caemmerer, S. von and Farquhar, G. D. (1981) 'Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves', *Planta*. Springer, 153(4), pp. 376–387.

Campa, C. *et al.* (2017) 'Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase', *Frontiers in Plant Science*, 8(July), pp. 1–16. doi: 10.3389/fpls.2017.01126.

Casal, J. J. (2013) 'Photoreceptor Signaling Networks in Plant Responses to Shade', *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), pp. 403–427. doi: 10.1146/annurev-arplant-050312-120221.

Ceballos, G., Ehrlich, P. R. and Dirzo, R. (2017) 'Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p. 201704949. doi: 10.1073/pnas.1704949114.

Cenci, A., Combes, M.-C. and Lashermes, P. (2012) 'Genome evolution in diploid and tetraploid *Coffea* species as revealed by comparative analysis of orthologous genome segments', pp. 135–145. doi: 10.1007/s11103-011-9852-3.

Chagué, V. *et al.* (2010) 'Genome-wide gene expression changes in genetically stable synthetic and natural wheat allohexaploids', *New Phytologist*, 187(4), pp. 1181–1194. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03339.x.

Chaiwanon, J. *et al.* (2016) 'Information integration and communication in plant growth regulation', *Cell*. Elsevier, 164(6), pp. 1257–1268.

Chang, F. C. and Swenson, R. P. (1997) 'Regulation of Oxidation–Reduction Potentials through Redox-Linked Ionization in the Y98H Mutant of the *Desulfovibrio vulgaris* [Hildenborough] Flavodoxin: Direct Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Evidence for the Redox-Dependent Shift in the', *Biochemistry*. ACS Publications, 36(29), pp. 9013–9021.

Chaudhary, B. *et al.* (2009) 'Reciprocal silencing, transcriptional bias and functional divergence of homeologs in polyploid cotton (*Gossypium*)', *Genetics*, 182(2), pp. 503–517. doi: 10.1534/genetics.109.102608.

Chelaifa, H., Mahé, F. and Ainouche, M. (2010) 'Transcriptome divergence between the hexaploid salt-

marsh sister species *Spartina maritima* and *Spartina alterniflora* (Poaceae)', *Molecular ecology*. Wiley Online Library, 19(10), pp. 2050–2063.

Chen, Z. J. (2007) 'Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids', *Annu. Rev. Plant Biol.* Annual Reviews, 58, pp. 377–406.

Chen, Z. J. (2013) 'Genomic and epigenetic insights into the molecular bases of heterosis', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 14(7), p. 471.

Cho, M. H. *et al.* (2012) 'Manipulation of triose phosphate/phosphate translocator and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase, the key components in photosynthetic sucrose synthesis, enhances the source capacity of transgenic *Arabidopsis* plants.', *Photosynthesis research*, 111(3), pp. 261–268. doi: 10.1007/s11120-012-9720-2.

Choudhury, F. K. *et al.* (2017) 'Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination', *The Plant Journal*. Wiley Online Library, 90(5), pp. 856–867.

Christen, D. *et al.* (2007) 'Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress', *Environmental and Experimental Botany*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.02.003.

Coate, J. E. *et al.* (2013) 'Transgressive physiological and transcriptomic responses to light stress in allopolyploid *Glycine dolichocarpa* (Leguminosae)', *Heredity*. Nature Publishing Group, 110(2), p. 160.

Comeau, A., Langevin, F. and Levesque, M. (2005) 'Root health: a world of complexity', *Phytoprotection*. QUEBEC SOC PROTECT PLANTS PHYTOPROTECTION, 2700 EINSTEIN R HOGUE# D 1 110, QUEBEC, QC G1P 3W8, CANADA, 86(1), pp. 43–52.

Correia, C. M. *et al.* (2005) 'Ultraviolet-B radiation and nitrogen affect the photosynthesis of maize: A Mediterranean field study', *European Journal of Agronomy*, 22(3), pp. 337–347. doi: 10.1016/j.eja.2004.05.002.

Couée, I. *et al.* (2006) 'Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants', *Journal of Experimental Botany*, 57(3), pp. 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027.

Cristancho, M. A. *et al.* (2012) 'Outbreak of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in Colombia', *New Disease Reports*. British Society for Plant Pathology, 25(19), pp. 588–2044.

Cristancho, M. A. *et al.* (2014) 'Annotation of a hybrid partial genome of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) contributes to the gene repertoire catalog of the Pucciniales', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media SA, 5.

Cros, J. *et al.* (1995) 'Nuclear DNA content in the subgenus *Coffea* (Rubiaceae): inter-and intra-specific variation in African species', *Canadian Journal of Botany*. NRC Research Press, 73(1), pp. 14–20.

Dalchau, N. *et al.* (2011) 'The circadian oscillator gene *GIGANTEA* mediates a long-term response of the *Arabidopsis thaliana* circadian clock to sucrose', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), pp. 5104–5109. doi: 10.1073/pnas.1015452108.

DaMatta, F. M. *et al.* (2008) 'In field-grown coffee trees source-sink manipulation alters photosynthetic rates, independently of carbon metabolism, via alterations in stomatal function', *New Phytologist*, 178(2), pp. 348–357. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02367.x.

DaMatta, F. M. and Cochicho Ramalho, J. D. (2006) 'Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A review', *Brazilian Journal of Plant Physiology*. doi: 10.1590/S1677-04202006000100006.

Darras, A. I., Bali, I. and Argyropoulou, E. (2015) 'Disease resistance and growth responses in

Pelargonium × hortorum plants to brief pulses of UV-C irradiation', *Scientia Horticulturae*. Elsevier, 181, pp. 95–101.

Davila Olivas, N. H. *et al.* (2016) 'Effect of prior drought and pathogen stress on Arabidopsis transcriptome changes to caterpillar herbivory', *New Phytologist*. Wiley Online Library, 210(4), pp. 1344–1356.

Davis, A. P. *et al.* (2006) 'An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae)', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152(4), pp. 465–512. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x.

Davis, A. P. (2011) 'Psilanthus mannii, the type species of Psilanthus, transferred to Coffea', *Nordic Journal of Botany*, 29(4), pp. 471–472. doi: 10.1111/j.1756-1051.2011.01113.x.

Demkura, P. V and Ballaré, C. L. (2012) 'UVR8 mediates UV-B-induced Arabidopsis defense responses against Botrytis cinerea by controlling sinapate accumulation', *Molecular Plant*. Elsevier, 5(3), pp. 642–652.

Demmig-Adams, B. and Adams, W. W. (2006) 'Photoprotection in an ecological context: The remarkable complexity of thermal energy dissipation', *New Phytologist*, 172(1), pp. 11–21. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01835.x.

Denoeud, F. *et al.* (2014) 'The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis', *science*. American Association for the Advancement of Science, 345(6201), pp. 1181–1184.

Deschamps, M. *et al.* (2016) 'Genomic Signatures of Selective Pressures and Introgression from Archaic Hominins at Human Innate Immunity Genes', *American Journal of Human Genetics*. The American Society of Human Genetics, 98(1), pp. 5–21. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.11.014.

Dodd, A. N. *et al.* (2005) 'Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage.', *Science (New York, N.Y.)*, 309(5734), pp. 630–633. doi: 10.1126/science.1115581.

Dodds, P. N. and Rathjen, J. P. (2010) 'Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 11(8), p. 539.

Dong, S. and Adams, K. L. (2011) 'Differential contributions to the transcriptome of duplicated genes in response to abiotic stresses in natural and synthetic polyploids', *new Phytologist*. Wiley Online Library, 190(4), pp. 1045–1057.

Dordas, C. (2008) 'Review article Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture . A review', 28, pp. 33–46.

Döring, T. F. *et al.* (2012) 'Concepts of plant health - reviewing and challenging the foundations of plant protection', *Plant Pathology*, 61(1), pp. 1–15. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02501.x.

Durrant, W. E. and Dong, X. (2004) 'Systemic acquired resistance', *Annu. Rev. Phytopathol.* Annual Reviews, 42, pp. 185–209.

Dussert, S. *et al.* (2006) 'Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds', *Physiologia Plantarum*, 127(2), pp. 192–204. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00666.x.

Duvick, D. N. (2001) 'Biotechnology in the 1930s: the development of hybrid maize', *Nature Reviews Genetics*, 2(1), pp. 69–74. doi: 10.1038/35047587.

E. Birch, A. N., Begg, G. S. and Squire, G. R. (2011) 'How agro-ecological research helps to address food security issues under new IPM and pesticide reduction policies for global crop production systems', *Journal of Experimental Botany*, 62(10), pp. 3251–3261. doi: 10.1093/jxb/err064.

Echeverria-beirute, F. *et al.* (2017) 'Rust and thinning management effect on cup quality and plant performance for two cultivars of Coffea arabica L.', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- Edwards, J. *et al.* (1998) 'Assessment of infection and sporulation processes of *Puccinia menthae* on peppermint in controlled conditions', *Australian Journal of Agricultural Research*, 49(7), pp. 1125–1132. doi: 10.1071/a98022.
- Ellis, J. G. *et al.* (2014) 'The past, present and future of breeding rust resistant wheat', *Frontiers in plant science*. Frontiers Media SA, 5.
- Farquhar, G. D. and Sharkey, T. D. (1982) 'Stomatal conductance and photosynthesis', *Annual review of plant physiology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 33(1), pp. 317–345.
- Farré, E. M. (2012) 'The regulation of plant growth by the circadian clock', *Plant Biology*, 14(3), pp. 401–410. doi: 10.1111/j.1438-8677.2011.00548.x.
- Fernandez, D., Talhinhos, P. and Duplessis, S. (2013) 'Rust Fungi : Achievements and Future Challenges on Genomics and Host – Parasite Interactions', in *The Mycota XI*.
- Feugier, F. G. and Satake, A. (2013) 'Dynamical feedback between circadian clock and sucrose availability explains adaptive response of starch metabolism to various photoperiods', *Frontiers in Plant Science*, 3(January), pp. 1–11. doi: 10.3389/fpls.2012.00305.
- Field, B., Jordán, F. and Osbourn, A. (2006) 'First encounters–deployment of defence-related natural products by plants', *New Phytologist*. Wiley Online Library, 172(2), pp. 193–207.
- Flagel, L. E. and Wendel, J. F. (2010) 'Evolutionary rate variation, genomic dominance and duplicate gene expression evolution during allotetraploid cotton speciation', *New Phytologist*. Wiley Online Library, 186(1), pp. 184–193.
- Foyer, C. H. *et al.* (2016) 'Cross- Tolerance to biotic and abiotic stresses in plants: A focus on resistance to aphid infestation', *Journal of Experimental Botany*. doi: 10.1093/jxb/erw079.
- Fukushima, A. *et al.* (2009) 'Impact of clock-associated Arabidopsis pseudo-response regulators in metabolic coordination', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), pp. 8791–8791. doi: 10.1073/pnas.0904226106.
- Galtier, N. *et al.* (1993) 'Effects of Elevated Sucrose-Phosphate Synthase Activity on Photosynthesis, Assimilate Partitioning, and Growth in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B).', *Plant physiology*, 101(2), pp. 535–543. doi: 10.1093/pli/101.2.535 [pii].
- Ghini, R., Bettiol, W. and Hamada, E. (2011) 'Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives', *Plant pathology*. Wiley Online Library, 60(1), pp. 122–132.
- Goel, A. K. *et al.* (2008) 'The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants', *Molecular plant-microbe interactions*. Am Phytopath Society, 21(3), pp. 361–370.
- Graf, A. *et al.* (2010) 'Circadian control of carbohydrate availability for growth in Arabidopsis plants at night', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20), pp. 9458–9463. doi: 10.1073/pnas.0914299107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0914299107.
- Greenham, K. and McClung, C. R. (2015) 'Integrating circadian dynamics with physiological processes in plants', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 16(10), pp. 598–610. doi: 10.1038/nrg3976.
- Griffon, M. (2010) 'Association internationale pour une agriculture écologiquement intensive'.
- Griffon, M. (2011) *Pour des agricultures écologiquement intensives*. Editions de l'Aube.

Groszmann, M. *et al.* (2014) ‘Intraspecific Arabidopsis hybrids show different patterns of heterosis despite the close relatedness of the parental genomes’, *Plant physiology*. Am Soc Plant Biol, p. pp-114.

Groszmann, M. *et al.* (2015) ‘Hormone-regulated defense and stress response networks contribute to heterosis in Arabidopsis F1 hybrids.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(46), pp. E6397–406. doi: 10.1073/pnas.1519926112.

Guha, A., Sengupta, D. and Reddy, A. R. (2013) ‘Polyphasic chlorophyll a fluorescence kinetics and leaf protein analyses to track dynamics of photosynthetic performance in mulberry during progressive drought’, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Elsevier, 119, pp. 71–83.

Harmer, S. L. (2009) ‘The Circadian System in Higher Plants’, *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), pp. 357–377. doi: 10.1146/annurev.arplant.043008.092054.

Haydon, M. J. *et al.* (2013) ‘Photosynthetic entrainment of the Arabidopsis circadian clock’, *Nature*, 502(7473), pp. 1–14. doi: 10.1038/nature12603.Photosynthetic.

Hegarty, M. J. *et al.* (2005) ‘Development of anonymous cDNA microarrays to study changes to the Senecio floral transcriptome during hybrid speciation’, *Molecular Ecology*, 14(8), pp. 2493–2510. doi: 10.1111/j.1365-294x.2005.02608.x.

Herrera, J. *et al.* (2008) ‘Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* ...’, (June 2016). doi: 10.1007/s10681-008-9860-9.

Herrera P., J. C. *et al.* (2008) ‘Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species’, *Euphytica*, 167(1), pp. 57–67. doi: 10.1007/s10681-008-9860-9.

Hsu, P. Y. and Harmer, S. L. (2014) ‘Wheels within wheels: The plant circadian system’, *Trends in Plant Science*. Elsevier Ltd, 19(4), pp. 240–249. doi: 10.1016/j.tplants.2013.11.007.

Hückelhoven, R. (2007) ‘Cell wall–associated mechanisms of disease resistance and susceptibility’, *Annu. Rev. Phytopathol.* Annual Reviews, 45, pp. 101–127.

Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C. A. (2006) ‘An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 103(26), pp. 10098–10103.

Inada, N. and Ueda, T. (2014) ‘Membrane trafficking pathways and their roles in plant–microbe interactions’, *Plant and Cell Physiology*. Oxford University Press, 55(4), pp. 672–686.

Ives, J. A. *et al.* (2014) ‘Ultraweak Photon Emission as a Non-Invasive Health Assessment: A Systematic Review’, *PLOS ONE*. Public Library of Science, 9(2), p. e87401. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087401>.

Izawa, T., Takahashi, Y. and Yano, M. (2003) ‘Comparative biology comes into bloom: Genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and Arabidopsis’, *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), pp. 113–120. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00014-1.

J.N.wintgens (2012) ‘The coffee plant’, in Nicolas, W. J. (ed.) *Coffee: Growing, processing, sustainable production*. Wiley-VCH, pp. 3–24.

Janich, P. (2002) ‘Between Natural Disposition and Cultural Masterment of Life—The Cognitive Sciences and Concept of Man in Conflicting Conceptions of Science’, in *On Human Nature*. Springer, pp. 95–110.

Jha, S. *et al.* (2012) ‘A Review of Ecosystem Services, Farmer Livelihoods, and Value Chains in Shade

Coffee Agroecosystems'. doi: 10.1007/978-94-007-1309-3_4.

Jiang, J. *et al.* (2017) 'WRKY transcription factors in plant responses to stresses', *Journal of integrative plant biology*. Wiley Online Library, 59(2), pp. 86–101.

Joët, T. *et al.* (2009) 'Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study', *New Phytologist*, 182(1), pp. 146–162. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02742.x.

Jones, D. F. (1917) 'Dominance of linked factors as a means of accounting for heterosis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 3(4), pp. 310–312.

Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006) 'The plant immune system', *Nature*. Nature Publishing Group, 444(7117), p. 323.

De Jong, E. J. *et al.* (1987) 'Temperature requirements for germination, germ tube growth and appressorium formation of urediospores of *Hemileia vastatrix*', *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 93(2), pp. 61–71. doi: 10.1007/BF01998091.

Júnior, J. H. *et al.* (2015) 'Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection', *Pesticide biochemistry and physiology*. Elsevier, 123, pp. 31–39.

Kaepler, S. (2012) 'Heterosis: many genes, many mechanisms—end the search for an undiscovered unifying theory', *ISRN Botany*. Hindawi Publishing Corporation, 2012.

Kalaji, H. M. *et al.* (2016) 'Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions', *Acta Physiologiae Plantarum*. doi: 10.1007/s11738-016-2113-y.

Kangasjärvi, S. *et al.* (2012) 'Photosynthesis, photorespiration, and light signalling in defence responses', *Journal of Experimental Botany*, 63(4), pp. 1619–1636. doi: 10.1093/jxb/err402.

Kelly, E. C. and Bliss, J. C. (2009) 'Healthy forests, healthy communities: an emerging paradigm for natural resource-dependent communities?', *Society and Natural Resources*. Taylor & Francis, 22(6), pp. 519–537.

Kim, D. *et al.* (2013) 'TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions', *Genome Biology*. BioMed Central Ltd, 14(4), p. R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.

Kim, T. H. *et al.* (2011) 'Chemical genetics reveals negative regulation of abscisic acid signaling by a plant immune response pathway', *Current Biology*, 21(11), pp. 990–997. doi: 10.1016/j.cub.2011.04.045.

Ko, D. K. *et al.* (2016) 'Temporal Shift of Circadian-Mediated Gene Expression and Carbon Fixation Contributes to Biomass Heterosis in Maize Hybrids', *PLoS Genetics*, 12(7), pp. 1–31. doi: 10.1371/journal.pgen.1006197.

Lambers, H. *et al.* (2009) 'Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective', *Plant and Soil*. Springer, 321(1–2), pp. 83–115.

Lashermes, P. *et al.* (1999) 'Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome', *Molecular and General Genetics MGG*. Springer, 261(2), pp. 259–266.

Lashermes, P. *et al.* (2000) 'Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.)', *Theoretical and applied genetics*. Springer, 100(1), pp. 139–146.

Lashermes, P., Andrade, A. C. and Etienne, H. (2008) 'Genomics of coffee one of the world's largest traded commodities', in *Genomics of tropical crop plants*. Springer, pp. 203–226.

- LeBoldus, J. M. *et al.* (2013) 'Testing the "hybrid susceptibility" and "phenological sink" hypotheses using the *P. balsamifera* - *P. deltoides* hybrid zone and septoria leaf spot [*Septoria musiva*]', *PLoS ONE*, 8(12). doi: 10.1371/journal.pone.0084437.
- Lee, H.-A. *et al.* (2017) 'Current Understandings of Plant Nonhost Resistance', *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Am Phytopath Society, 30(1), pp. 5–15.
- Lee, S. C. and Luan, S. (2012) 'ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses', *Plant, Cell & Environment*. Wiley Online Library, 35(1), pp. 53–60.
- Leivar, P. and Monte, E. (2014) 'PIFs: Systems Integrators in Plant Development', *The Plant Cell*, 26(1), pp. 56–78. doi: 10.1105/tpc.113.120857.
- Li, G. *et al.* (2012) 'Effects of nitrogen on photosynthetic characteristics of leaves from two different stay-green corn (*Zea mays* L.) varieties at the grain-filling stage', *Canadian Journal of Plant Science*. BioOne, 92(4), pp. 671–680.
- Lin, B. B. (2011) 'Resilience in agriculture through crop diversification: adaptive management for environmental change', *BioScience*. American Institute of Biological Sciences Circulation, AIBS, 1313 Dolley Madison Blvd., Suite 402, McLean, VA 22101. USA, 61(3), pp. 183–193.
- López-Bravo, D. F., Virginio-Filho, E. de M. and Avelino, J. (2012) 'Shade is conducive to coffee rust as compared to full sun exposure under standardized fruit load conditions', *Crop Protection*. Elsevier, 38, pp. 21–29.
- Love, M. I., Huber, W. and Anders, S. (2014) 'Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2', *Genome Biology*, 15(12), p. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Lozano-Durán, R. and Zipfel, C. (2015) 'Trade-off between growth and immunity: role of brassinosteroids', *Trends in plant science*. Elsevier, 20(1), pp. 12–19.
- Lu, J. *et al.* (2015) 'Induced jasmonate signaling leads to contrasting effects on root damage and herbivore performance', *Plant physiology*. Am Soc Plant Biol, 167(3), pp. 1100–1116.
- Lucas, J. A. (2009) *Plant pathology and plant pathogens*. John Wiley & Sons.
- Lucas, M. and Prat, S. (2014) 'PIFs get BRight: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as integrators of light and hormonal signals', *New Phytologist*. Wiley Online Library, 202(4), pp. 1126–1141.
- LUKENS, L. N. *et al.* (2004) 'Genome redundancy and plasticity within ancient and recent Brassica crop species', *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), pp. 665–674. Available at: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00352.x>.
- Mackay, T. F. C., Stone, E. A. and Ayroles, J. F. (2009) 'The genetics of quantitative traits: challenges and prospects', *Nature Reviews Genetics*, 10(8), pp. 565–577. doi: 10.1038/nrg2612.
- Magarey, R. D., Sutton, T. B. and Thayer, C. L. (2005) 'A Simple Generic Infection Model for Foliar Fungal Plant Pathogens', *Phytopathology*, 95(1), pp. 92–100. doi: 10.1094/PHYTO-95-0092.
- Maricle, B. R. *et al.* (2006) 'Respiratory enzyme activities correlate with anoxia tolerance in salt marsh grasses', *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. Elsevier, 337(1), pp. 30–37.
- Marraccini, P. *et al.* (2012) 'Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*', *Journal of experimental botany*. Oxford University Press, 63(11), pp. 4191–4212.
- Matos, F. S. *et al.* (2009) 'Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree', *Environmental and*

Experimental Botany. doi: 10.1016/j.envexpbot.2009.06.018.

Maurin, O. *et al.* (2007) 'Towards a phylogeny for Coffea (Rubiaceae): Identifying well-supported lineages based on nuclear and plastid DNA sequences', *Annals of Botany*, 100(7), pp. 1565–1583. doi: 10.1093/aob/mcm257.

Mccook, S. and Vandermeer, J. (2015) 'The Big Rust and the Red Queen: Long-Term Perspectives on Coffee Rust Research', *phytopathology*, pp. 1164–1173. doi: 10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW.

Meldau, S., Erb, M. and Baldwin, I. T. (2012) 'Defence on demand: mechanisms behind optimal defence patterns', *Annals of botany*. Oxford University Press, 110(8), pp. 1503–1514.

Meyer, R. C. *et al.* (2004) 'Heterosis of biomass production in Arabidopsis. Establishment during early development', *Plant physiology*. Am Soc Plant Biol, 134(4), pp. 1813–1823.

Michael, T. P. *et al.* (2003) 'Enhanced fitness conferred by naturally occurring variation in the circadian clock', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 302(5647), pp. 1049–1053.

Miller, M. *et al.* (2015) 'Natural variation in timing of stress-responsive gene expression predicts heterosis in intraspecific hybrids of Arabidopsis', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(May), p. 7453. doi: 10.1038/ncomms8453.

Miller, M., Zhang, C. and Chen, Z. J. (2012) 'Ploidy and Hybridity Effects on Growth Vigor and Gene Expression in *Arabidopsis thaliana* Hybrids and Their Parents', *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 2(4), pp. 505–513. doi: 10.1534/g3.112.002162.

Mittler, R. (2006) 'Abiotic stress, the field environment and stress combination', *Trends in Plant Science*. doi: 10.1016/j.tplants.2005.11.002.

Mittler, R. and Blumwald, E. (2010a) 'Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives', *Annual review of plant biology*. Annual Reviews, 61, pp. 443–462.

Mittler, R. and Blumwald, E. (2010b) 'Genetic Engineering for Modern Agriculture: Challenges and Perspectives', *Annu. Rev. Plant Biol*, 61, pp. 443–62. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112116.

Mora-García, S., de Leone, M. J. and Yanovsky, M. (2017) 'Time to grow: circadian regulation of growth and metabolism in photosynthetic organisms', *Current opinion in plant biology*. Elsevier, 35, pp. 84–90.

Mukherjee, A. K. *et al.* (2009) 'A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with *Arabidopsis thaliana* ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature', *BMC plant biology*. BioMed Central, 9(1), p. 31.

Nagel, D. H. and Kay, S. A. (2012) 'NIH Public Access', *Current Biology*, 141(4), pp. 520–529. doi: 10.1016/j.surg.2006.10.010.Use.

Narang, R. A. and Altmann, T. (2001) 'Phosphate acquisition heterosis in *Arabidopsis thaliana*: a morphological and physiological analysis', *Plant and Soil*. Springer, 234(1), pp. 91–97.

Naseem, M., Kaldorf, M. and Dandekar, T. (2015) 'The nexus between growth and defence signalling: auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways', *Journal of experimental botany*. Oxford University Press UK, 66(16), pp. 4885–4896.

Nguyen, D. *et al.* (2016) 'How plants handle multiple stresses: hormonal interactions underlying responses to abiotic stress and insect herbivory', *Plant molecular biology*. Springer, 91(6), pp. 727–740.

Ni, Z. *et al.* (2009) 'Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids', *Nature*. Nature Publishing Group, 457(7227), pp. 327–331. doi: 10.1038/nature07523.

- Nomoto, Y. *et al.* (2012) 'Circadian clock-and PIF4-controlled plant growth: A coincidence mechanism directly integrates a hormone signaling network into the photoperiodic control of plant architectures in *arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 53(11), pp. 1950–1964. doi: 10.1093/pcp/pcs137.
- Nutman, F. J., Roberts, F. M. and Clarke, R. T. (1963) 'Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br', *Transactions of the British Mycological Society*. British Mycological Society, 46(1), pp. 27–44. doi: 10.1016/S0007-1536(63)80005-4.
- Osuna-Canizalez, F. J., De Datta, S. K. and Bonman, J. M. (1991) 'Nitrogen form and silicon nutrition effects on resistance to blast disease of rice', *Plant and Soil*. Springer, 135(2), pp. 223–231.
- Otto, S. P. and Whitton, J. (2000) 'Polyploid incidence and evolution', *Annual review of genetics*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 34(1), pp. 401–437.
- Pandey, S. P. *et al.* (2010) 'Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of *Arabidopsis*', *The Plant Journal*. Wiley Online Library, 64(6), pp. 912–923.
- Pandey, S. P. and Somssich, I. E. (2009) 'The Role of WRKY Transcription Factors in Plant Immunity', *Plant Physiology*, 150(4), pp. 1648–1655. doi: 10.1104/pp.109.138990.
- Passador-Gurgel, G. *et al.* (2007) 'Quantitative trait transcripts for nicotine resistance in *Drosophila melanogaster*', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 39(2), p. 264.
- Patsoukis, N. and Georgiou, C. D. (2007) 'Effect of thiol redox state modulators on oxidative stress and sclerotial differentiation of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*', *Archives of microbiology*. Springer, 188(3), pp. 225–233.
- Van de Peer, Y., Maere, S. and Meyer, A. (2009) 'The evolutionary significance of ancient genome duplications', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 10(10), p. 725.
- Ploetz, R. C. (2007) 'Diseases of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Diverse Environments', *plant Disease*, 91(6). doi: 10.1094/PDIS-91-6-0644.
- Ponte, S. (2002) 'The "Latte Revolution"? Regulation, markets and consumption in the global coffee chain', *World Development*. doi: 10.1016/S0305-750X(02)00032-3.
- Popp, J., Peto, K. and Nagy, J. (2013) 'Pesticide productivity and food security. A review', *Agronomy for Sustainable Development*, 33(1), pp. 243–255. doi: 10.1007/s13593-012-0105-x.
- Prasch, C. M. and Sonnewald, U. (2015) 'Signaling events in plants: Stress factors in combination change the picture', *Environmental and Experimental Botany*, 114, pp. 4–14. doi: 10.1016/j.envexpbot.2014.06.020.
- Prentis, P. J. *et al.* (2008) 'Adaptive evolution in invasive species', *Trends in plant science*. Elsevier, 13(6), pp. 288–294.
- Raina, S. N., Mukai, Y. and Yamamoto, M. (1998) 'In situ hybridization identifies the diploid progenitor species of *Coffea arabica* (Rubiaceae)', *TAG Theoretical and Applied Genetics*. Springer, 97(8), pp. 1204–1209.
- Raines M.A. (1922) 'Vegetative Vigor of the Host as a Factor Influencing Susceptibility and Resistance to Certain Rust Diseases of the Higher Plants', *American Journal of Botany*, 9(5), pp. 215–238.
- Ramakers, C. *et al.* (2003) 'Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data', *Neuroscience Letters*, 339(1), pp. 62–66. doi: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.
- Ramalho, J. C. *et al.* (1997) 'Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability', *Physiologia Plantarum*, 101(1), pp. 229–239. doi: 10.1034/j.1399-

3054.1997.1010130.x.

Ramiro, D. *et al.* (2010) 'Identification of coffee WRKY transcription factor genes and expression profiling in resistance responses to pathogens', *Tree Genetics and Genomes*, 6(5), pp. 767–781. doi: 10.1007/s11295-010-0290-1.

Ramiro, D. a. *et al.* (2009) 'Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars', *Plant Pathology*, 58(5), pp. 944–955. doi: 10.1111/j.1365-3059.2009.02122.x.

Ramsey, U. P. *et al.* (1998) 'Biosynthesis of domoic acid by the diatom *Pseudo-nitzschia multiseries*', *Natural toxins*. Wiley Online Library, 6(3-4), pp. 137–146.

Rapp, R. A., Udall, J. A. and Wendel, J. F. (2009) 'Genomic expression dominance in allopolyploids', *BMC Biology*, 7(1), p. 18. doi: 10.1186/1741-7007-7-18.

Rapp, R. A. and Wendel, J. F. (2005) 'Epigenetics and plant evolution', *New Phytologist*, 168(1), pp. 81–91. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01491.x.

Redillas, M. C. F. R. *et al.* (2011) 'JIP analysis on rice (*Oryza sativa* cv Nipponbare) grown under limited nitrogen conditions', *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. Springer, 54(5), pp. 827–832.

Rejeb, K. Ben, Abdelly, C. and Saviouré, A. (2014) 'How reactive oxygen species and proline face stress together', *Plant Physiology and Biochemistry*. Elsevier, 80, pp. 278–284.

Ripoll, J. *et al.* (2016) 'A User's View of the Parameters Derived from the Induction Curves of Maximal Chlorophyll a Fluorescence: Perspectives for Analyzing Stress', *Frontiers in Plant Science*, 7(November), pp. 1–6. doi: 10.3389/fpls.2016.01679.

Ripoll, J., Urban, L. and Bertin, N. (2016) 'The potential of the MAGIC TOM parental accessions to explore the genetic variability in tomato acclimation to repeated cycles of water deficit and recovery', *Frontiers in plant science*. Frontiers, 6, p. 1172.

Rizhsky, L. *et al.* (2004) 'When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress', *Plant physiology*. Am Soc Plant Biol, 134(4), pp. 1683–1696.

Roche, B. M. and Fritz, R. S. (1998) 'Effects of host plant hybridization on resistance to willow leaf rust caused by *Melampsora* sp.', *European Journal of Forest Pathology*, 28(4), pp. 259–270. doi: none.

Rodrigues Jr, C. J., Bettencourt, A. J. and Rijo, L. (1975) 'Races of the pathogen and resistance to coffee rust', *Annual Review of Phytopathology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 13(1), pp. 49–70.

Rohde, R. S., Studer, R. K. and Chu, C. R. (2004) 'Mini-pig fresh osteochondral allografts deteriorate after 1 week of cold storage.', *Clinical orthopaedics and related research*. LWW, 427, pp. 226–233.

Romero, G. *et al.* (2014) 'Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*)', *Plant Breeding*. Edited by T. Debener, 133(1), pp. 121–129. doi: 10.1111/pbr.12127.

Royer, M. *et al.* (2013) 'Is the C:N ratio a reliable indicator of C allocation to primary and defence-related metabolisms in tomato?', *Phytochemistry*. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.12.003.

Rozo, Y. *et al.* (2012) 'Aggressiveness and genetic diversity of *Hemileia vastatrix* during an epidemic in Colombia', *Journal of Phytopathology*. Wiley Online Library, 160(11–12), pp. 732–740.

- Samson, N. *et al.* (2007) 'The complete nucleotide sequence of the coffee (*Coffea arabica* L.) chloroplast genome: organization and implications for biotechnology and phylogenetic relationships amongst angiosperms', *Plant Biotechnology Journal*, 5(2), pp. 339–353. doi: 10.1111/j.1467-7652.2007.00245.x.
- Schimitschek, E. (1952) 'Über Krankheitsbegriff, Disposition und Vorbeugung im Forstschutz', *Journal of Applied Entomology*. Wiley Online Library, 33(1-2), pp. 18–31.
- Schlösser, E. (1997) *Allgemeine Phytopathologie*. Thieme.
- Schluttenhofer, C. and Yuan, L. (2015) 'Regulation of Specialized Metabolism by WRKY Transcription Factors', *Plant Physiology*, 167(2), pp. 295–306. doi: 10.1104/pp.114.251769.
- Schnable, P. S. and Springer, N. M. (2013) 'Progress toward understanding heterosis in crop plants', *Annual review of plant biology*. Annual Reviews, 64, pp. 71–88.
- Schnable, P. S. and Springer, N. M. (2013) 'Progress Toward Understanding Heterosis in Crop Plants', *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), pp. 71–88. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103827.
- Seaton, D. D. *et al.* (2015) 'Linked circadian outputs control elongation growth and development in response to photoperiod and temperature', *Molecular Systems Biology*, pp. 1–20. doi: 10.15252/msb.20145766.
- Sharma, R. *et al.* (2013) 'Recent advances in dissecting stress-regulatory crosstalk in rice', *Molecular Plant*. doi: 10.1093/mp/sss147.
- Shen, G. *et al.* (2015) 'The regulatory network mediated by circadian clock genes is related to heterosis in rice', *Journal of Integrative Plant Biology*, 57(3), pp. 300–312. doi: 10.1111/jipb.12240.
- Shen, H. *et al.* (2012) 'Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two *Arabidopsis* ecotypes and their reciprocal hybrids', *The Plant Cell*. Am Soc Plant Biol, 24(3), pp. 875–892.
- Shull, G. H. (1908) 'A new Mendelian ratio and several types of latency', *The American Naturalist*. Science Press, 42(499), pp. 433–451.
- Silva, M. C. *et al.* (2002) 'Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves', *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60(4), pp. 169–183. doi: 10.1006/pmpp.2002.0389.
- Silva, M. D. C. *et al.* (2006) 'Coffee resistance to the main diseases: Leaf rust and coffee berry disease', *Brazilian Journal of Plant Physiology*. doi: 10.1016/j.ijepes.2005.11.005.
- Silvestre, S. *et al.* (2014) 'Performance index: an expeditious tool to screen for improved drought resistance in the *Lathyrus* genus', *Journal of integrative plant biology*. Wiley Online Library, 56(7), pp. 610–621.
- Soltis, P. S. and Soltis, D. E. (2009) 'The role of hybridization in plant speciation', *Annual review of plant biology*. Annual Reviews, 60, pp. 561–588.
- Sparks, E., Wachsman, G. and Benfey, P. N. (2013) 'Spatiotemporal signalling in plant development', *Nature reviews. Genetics*. NIH Public Access, 14(9).
- Stirbet, A. (2011) 'Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II : Basics and applications of the OJIP fluorescence transient q', *JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY & PHOTOBIOLOGY, B: BIOLOGY*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.
- Stirbet, A. and Govindjee (2011) 'On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient', *Journal of*

Photochemistry and Photobiology B: Biology. Elsevier B.V., 104(1–2), pp. 236–257. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.12.010.

Sung, J. *et al.* (2015) ‘Metabolomic profiling from leaves and roots of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants grown under nitrogen, phosphorus or potassium-deficient condition’, *Plant Science*. Elsevier Ireland Ltd, 241, pp. 55–64. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.09.027.

Suzuki, N. *et al.* (2014) ‘Abiotic and biotic stress combinations’, *New Phytologist*. Wiley Online Library, 203(1), pp. 32–43.

Swarup, K. *et al.* (1999) ‘Natural allelic variation identifies new genes in the *Arabidopsis* circadian system’, *The Plant Journal*. Wiley Online Library, 20(1), pp. 67–77.

Takumi, S. *et al.* (2009) ‘Natural variation of morphological traits in wild wheat progenitor *Aegilops tauschii* Coss.’, *Breeding Science*. Japanese Society of Breeding, 59(5), pp. 579–588.

Talhinhas, P. *et al.* (2017) ‘Pathogen profile The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix* : one and a half centuries around the tropics’, 8(20 17), pp. 1039–1051. doi: 10.1111/mpp.12512.

Thalman, M. and Santelia, D. (2017) ‘Starch as a determinant of plant fitness under abiotic stress’, *New Phytologist*, 214(3), pp. 943–951. doi: 10.1111/nph.14491.

Tian, T. *et al.* (2017) ‘agriGO v2. 0: a GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update’, *Nucleic Acids Research*.

Tollenaar, M., Ahmadzadeh, A. and Lee, E. A. (2004) ‘Physiological basis of heterosis for grain yield in maize’, *Crop Science*. Crop Science Society of America, 44(6), pp. 2086–2094.

Torquebiau, E. (2015) *Changement climatique et agricultures du monde*. Éditions Quae.

Vaast, P. *et al.* (2006) ‘Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions’, *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/jsfa.2338.

Van der Vossen, H. A. M. (2001) ‘Agronomy I: coffee breeding practices’, *Coffee: recent developments*. Wiley Online Library, pp. 184–201.

Van Der Vossen, H. *et al.* (2015) ‘Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review’, *Euphytica*, 204, pp. 243–256. doi: 10.1007/s10681-015-1398-z.

Wang, J. *et al.* (2006) ‘Genomewide nonadditive gene regulation in *Arabidopsis* allotetraploids’, *Genetics*, 172(1), pp. 507–517. doi: 10.1534/genetics.105.047894.

Wikström, N. *et al.* (2015) ‘A revised time tree of the asterids: Establishing a temporal framework for evolutionary studies of the coffee family (Rubiaceae)’, *PLoS ONE*, 10(5), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.pone.0126690.

Wilson, K. E. *et al.* (2006) ‘Energy balance, organellar redox status, and acclimation to environmental stress’, *Botany*. NRC Research Press, 84(9), pp. 1355–1370.

Xue, A., Wang, H. and Zhu, J. (2017) ‘Dissecting genetic architecture of startle response in *Drosophila melanogaster* using multi-omics information’, *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), p. 12367. doi: 10.1038/s41598-017-11676-1.

Yang, L. *et al.* (2015) ‘Salicylic acid biosynthesis is enhanced and contributes to increased biotrophic pathogen resistance in *Arabidopsis* hybrids’, *Nature communications*. Nature Publishing Group, 6, p. 7309.

Yasuda, M. *et al.* (2008) ‘Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic

acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis', *The Plant Cell*. Am Soc Plant Biol, 20(6), pp. 1678–1692.

Zipfel, C. (2009) 'Early molecular events in PAMP-triggered immunity', *Current opinion in plant biology*. Elsevier, 12(4), pp. 414–420.

Zipfel, C. (2014) 'Plant pattern-recognition receptors', *Trends in immunology*. Elsevier, 35(7), pp. 345–351.

Partie 7. Annexes



Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase

Claudine Campa^{1*}, Laurent Urban², Laurence Mondolot³, Denis Fabre⁴, Sandrine Roques⁴, Yves Lizzi², Jawad Aarrouf², Sylvie Doubeau⁵, Jean-Christophe Breittler⁶, Céline Letrez¹, Lucile Toniutti⁶, Benoit Bertrand⁶, Philippe La Fisca³, Luc P. R. Bidel⁷ and Hervé Etienne⁶

¹ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche-Interactions Plantes Microorganismes Environnement, IRD, CIRAD, Université de Montpellier, Montpellier, France, ² Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Centre d'Avignon, UR 1115 Plantes et Systèmes de Culture Horticoles, Avignon, France, ³ Laboratoire de Botanique, Phytochimie et Mycologie, Faculté de Pharmacie, Unité Mixte de Recherche 5175 Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Montpellier, France, ⁴ CIRAD, Unité Mixte de Recherche-Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes Méditerranéennes et Tropicales, Montpellier, France, ⁵ Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Unité Mixte de Recherche-Diversité Adaptation et Développement des Plantes, IRD, Université de Montpellier, Montpellier, France, ⁶ CIRAD, Unité Mixte de Recherche-Interactions Plantes Microorganismes Environnement, IRD, CIRAD, Université de Montpellier, Montpellier, France, ⁷ Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Unité Mixte de Recherche-Amélioration Génétique et Adaptation des Plantes Méditerranéennes et Tropicales, Montpellier, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Bernard Grodzinski,
University of Guelph, Canada

Reviewed by:

Simon Pearson,
University of Lincoln, United Kingdom
Christopher John Lambrides,
The University of Queensland,
Australia

*Correspondence:

Claudine Campa
claudine.campa@ird.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Crop Science and Horticulture,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 17 March 2017

Accepted: 12 June 2017

Published: 14 July 2017

Citation:

Campa C, Urban L, Mondolot L, Fabre D, Roques S, Lizzi Y, Aarrouf J, Doubeau S, Breittler J-C, Letrez C, Toniutti L, Bertrand B, La Fisca P, Bidel LPR and Etienne H (2017) Juvenile Coffee Leaves Acclimated to Low Light Are Unable to Cope with a Moderate Light Increase. *Front. Plant Sci.* 8:1126. doi: 10.3389/fpls.2017.01126

The understory origin of coffee trees and the strong plasticity of *Coffea arabica* leaves in relation to contrasting light environments have been largely shown. The adaptability of coffee leaves to changes in light was tested under controlled conditions by increasing the illumination rate on *C. arabica* var. Naryelis seedlings acclimated to low light conditions and observing leaf responses at three different developmental stages (juvenile, growing and mature). Only mature leaves proved capable of adapting to new light conditions. In these leaves, different major mechanisms were found to contribute to maintaining a good photosynthetic level. With increased illumination, a high photosynthetic response was conserved thanks to fast nitrogen remobilization, as indicated by SPAD values and the photorespiration rate. Efficient photoprotection was accompanied by a great ability to export sucrose, which prevented excessive inhibition of the Calvin cycle by hexose accumulation. In contrast, in younger leaves, increased illumination caused photodamage, observable even after 9 days of treatment. One major finding was that young coffee leaves rely on the accumulation of chlorogenic acids, powerful antioxidant phenolic compounds, to deal with the accumulation of reactive oxygen species rather than on antioxidant enzymes. Due to a lack of efficient photoprotection, a poor ability to export sucrose and inadequate antioxidant protection, younger leaves seemed to be unable to cope with increased illumination. In these leaves, an absence of induced antioxidant enzyme activity was accompanied, in growing leaves, by an absence of antioxidant synthesis or, in juvenile leaves, inefficient synthesis of flavonoids because located in some epidermis cells. These observations showed that coffee leaves, at the beginning of their development, are not equipped to withstand quick switches to higher light levels. Our results confirm that coffee trees, even selected for full sunlight conditions, remain shade plants possessing leaves able to adapt to higher light levels only when mature.

Keywords: antioxidant activity, Arabica, coffee culture, phenolics, photoprotection, plasticity

INTRODUCTION

Among the numerous (around 120) wild species, all native to tropical and intertropical forests, making up the *Coffea* genus, only two have been selected for coffee production: *Coffea arabica* and *C. canephora*. Since the beginning of cultivation in Yemen or in Ethiopia (Harar) in the 14th century, *C. arabica* has generally been grown in full sunlight, in order to improve coffee bean quality and increase yield. It was recently shown that *C. arabica* full-sun trees from the first domestication center in Yemen form a genetic group called Harar-Yemen, to which the variety studied here belongs and which differs from the native wild coffee species (Klein et al., 2016). This ability to acclimate to full-sun light environments reflects the considerable plasticity of coffee leaves, highlighted in numerous eco-physiology studies (Nunes et al., 1993; Fahl et al., 1994; Da Matta, 2004).

As light is the main source of life for plants, they have developed a multilevel network to optimize the capture of light energy needed for optimum photosynthesis, whatever the light intensity (Nguyen et al., 1998; Martins et al., 2014a). When light energy suddenly exceeds that required for photosynthesis, an energy imbalance may occur, leading to photoinhibition and, under extreme conditions, to irreversible damage of the core components of the protein complex PSII. A concomitant rapid decrease in the photosynthetic electron transport rate occurs, preventing further production of reactive oxygen species (ROS) and might be considered as a mechanism of short-term adaptation to increased light. Persistent changes in light necessitate acclimation and the induction of a multilevel strategy to cope with the excess irradiation, with a view to controlling light absorption and dealing with the overflow of captured light energy. The first objective may be fulfilled by morphological and anatomical modifications, consisting in leaf area variation, leaf inclination or, in young leaves, an increase in trichome number, surface waxes, and cuticle or cell wall epidermis thickening (Jansen, 2002; Robson et al., 2015). The second is based on the establishment of a series of physiological adaptations set to fight against photo-oxidative stress. An immediate response consists in establishing a photoprotective mechanism with xanthophylls, carotenoids that remove excess excitation energy, dissipating excess energy by non-photochemical reactions (thermal reaction or alternative pathways) and activating ROS scavengers (antioxidant enzymes and protectants such as tocopherols or phenolic antioxidants) (Grace and Logan, 2000). However, excessive electron flows may also be rerouted toward photorespiration and other alternative electron sinks, like the Mehler reaction or nitrate reduction. Cyclic electron flow, a pathway possibly linked to chlororespiration, may be activated too and, by balancing energy and electron flows, may prevent ROS generation (Munekage et al., 2004). Later, during the acclimation step, general cell metabolism is modified leading, in particular, to the production of compounds with antioxidant properties, such

as hydroxycinnamic acids and flavonoids (Bidel et al., 2007, 2015), which reduces the quantity of light entering the leaf (Day, 1993).

Following the work of Waterman et al. (1984) on *Barteria fistulosa*, numerous studies on rain-forest plants were conducted and showed a strong relationship between light and phenolic metabolism. The phenolic pool, including hydroxycinnamic acids and their esters (HCEs) such as chlorogenic acid (5-CQA), is generally greater in young leaves and in full-sun rather than in shade leaves, whatever the plants: understory shrubs, semi-shade or full-sun grasses and trees (Mole et al., 1988; Islam et al., 2003; Ingersoll et al., 2010). Besides being defense compounds against herbivores, phenolics also protect leaves from photodamage, acting as light screens and as antioxidants when leaves are under oxidative pressure (Close and McArthur, 2002).

In coffee leaves, light absorption seems to be mainly controlled by morphological and anatomical plasticity (variation in leaf area and inclination) more than through physiological adaptations (Araujo et al., 2008). *C. arabica* leaves perform well at full exposure, despite a low photosynthetic rate when compared to other tropical tree species (Da Matta, 2004; Martins et al., 2014b). They usually dissipate the excess excitation energy through thermal or non-photosynthetic mechanisms to recover quickly from photoinhibition (Ramalho et al., 2000). Surprisingly, as shown by Chaves et al. (2008) when comparing leaves of *C. arabica* cultivated in the field under 48 and 100% natural light, ROS detoxification did not seem to occur through the classic key antioxidant enzymes, as their activity level was identical under both sets of growing conditions.

Coffee trees naturally accumulate a large quantity of phenolics from the HCE group. These compounds which are usually called chlorogenic acids, are described as potent antioxidants and considered to be involved in plant defenses, as their tissue concentration evolves under biotic or abiotic stress (Maher et al., 1994; Grace et al., 1998; Tegelberg et al., 2004). Analyses of HCE content in the different parts of the two cultivated species highlighted an intense accumulation of these compounds, together with caffeine, a purine alkaloid, in the developing green parts of the plants, i.e., the bud, the apical part of the stem, and the young pericarp (Campa et al., 2012). The apex of *C. canephora* plantlets appeared to be extremely rich in these compounds and more particularly in HCEs, which reached a value of around 14% of dry mass (Mahesh et al., 2007). Another potent antioxidant, mangiferin, a glycosylated xanthone, largely accumulates in *C. arabica* leaves (Campa et al., 2012). Flavonoids are phenolics that play a major UV-screening role in leaves. They are abundant in coffee leaves exposed to full sunlight conditions but their screening role has yet to be described in these organs, except in a recent study in which, unfortunately, their concentration was not given (Martins et al., 2014a).

All existing studies concern mature leaves from trees subjected to long periods of contrasting light conditions. Few data exist on the short-term response of coffee leaves to irradiance modifications and on the specific response of young coffee leaves which, being located at the top of the canopy, lie at the forefront when light conditions change. Mature, field-grown leaves have already been subjected to light changes during their growth; it is

Abbreviations: 5-CQA, 5-caffeoylquinic acid, chlorogenic acid; CQA, caffeoylquinic acid; DiCQA, dicaffeoylquinic acid; FQA, feruloylquinic acid; HCE, hydroxycinnamoyl ester; TS, transverse section.

therefore to be expected that they have equipped themselves with a full range of mechanisms of adaptation to light changes (Müller-Xing et al., 2014). To date, despite numerous studies on mature leaves of trees grown in the field or greenhouse, the adaptive mechanisms put in place by young shaded coffee leaves to cope with fluctuations in light intensity, and more especially the role of the major leaf antioxidants, phenolics, have not yet been clearly elucidated.

The objective of the study presented here is to fill that gap. We chose to work under growth chamber conditions. Although the quality and intensity of light are different from natural conditions, growth chambers have the advantage of providing better control of environmental conditions. *C. arabica* plants were maintained for 3 months under low light conditions suitable for shade plants (classically used for coffee culture under growth chamber conditions and equivalent to $300 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and then subjected to light increase in order to study adaptive responses. The adaptive mechanisms were analyzed for 9 days on leaves at three different developmental stages by focusing on the responses of the photosynthetic machinery, and the carbon and phenolic metabolisms.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Light Stress Experiment

Seeds of *C. arabica* var. Naryelis were harvested at the La Cumplida research center (Matagalpa, Nicaragua), depulped, fermented and dried to a 30% moisture content. Germination and plantlet conversion were performed at CIRAD (Montpellier, France) in growth chambers (65–75% humidity, 27°C day/ 22°C night, 12h photoperiod). Light was provided by Gavita HortiStar 600 SE EU (Holland) lamps, which were arranged to provide a photosynthetically active radiation (PAR) of $300 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ to the top of the plantlets. Low light regimes, similar to those encountered under shade (Araujo et al., 2008) are commonly used for this understory species to grow plantlets in growth chambers (Thioune et al., 2017; Alves et al., in press). Water was supplied each day and plantlets were cultivated for 3 months under these conditions. Measurements were taken on leaves from 6-month-old plantlets (around 35 cm tall).

The experiment consisted in exposing the plantlets to an increase in light irradiance at day 0 and studying their physiological response over 9 days, leaving the other culture conditions unchanged. Before the light increase experiment, measurements were taken on day 0 (D0) and were used as a reference. During the experiment from day 0 after the first harvest to day 9, the lamps were placed closer to the plants but not excessively so as to avoid any modification of other environmental parameters such as temperature or relative humidity at the plant apex, as confirmed by control measurement. The light intensity was then set at $500 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

On six dates of the kinetic [D0, D1, D2, D4, D7, D9 corresponding to control (0) and 1, 2, 4, 7, 9 days after starting

to apply the increased light flow, respectively], five of the 35 plants were randomly selected to measure leaf gas exchanges and chlorophyll fluorescence and evaluate leaf antioxidant enzyme activities and biochemical content.

Three leaf developmental stages were chosen: juvenile and growing leaves from the first and second node below the apex (F1 and F2), and mature leaves (F3) from the third node (Supplementary Figure S1). These leaves differed in their average area, with F1 and F2 corresponding to 67 and 90% of the mean area of F3 leaves ($F1 = 33.36 \pm 4.35$; $F2 = 38.48 \pm 1.65$; $F3 = 42.69 \pm 1.77 \text{ cm}^2$).

Alongside leaf photosynthesis and chlorophyll fluorescence measurements, the three types of leaves were collected after 5 h of lighting (at 2 pm local time) for further biochemical analyses from three different trees of both sets. Leaves were immediately frozen in liquid nitrogen, and kept at -80°C until analysis. The frozen material was directly used for enzymatic analyses or freeze-dried for subsequent metabolite analysis.

Leaf Gas Exchange Measurements

Leaf photosynthesis was measured with a portable gas exchange measurement system (GFS-3000, Walz, Germany). Measurements of the net assimilation rate (A_{net}) and of stomatal conductance (g_s) were taken *in situ* between 10 am and 1 pm. The photon flux density was fixed at $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of Photosynthetic Active Radiation (PAR) before the experiment and at D0, and increased to $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a threshold value beyond which the lamps applied excessive heat to the leaves. CO_2 concentration was set at 400 ppm, leaf temperature at 28°C , and relative humidity in the cuvette at 65%, and a constant flow rate through the cuvette of 800 ml min^{-1} was imposed. The 8 cm^2 exchange area of the Walz cuvette was fully covered by leaves, and the environmental conditions in the leaf chamber were set to achieve a leaf-to-air vapor pressure deficit between 1.2 and 1.4 kPa. At the end of the gas exchange measurements, the light source was turned off for 4 min and the dark respiration rate was measured.

Then A_{max} , which is an estimate of photosynthetic capacity, was measured under saturating conditions, at a photon flux density of $1500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of PAR, under a CO_2 concentration of 1800 ppm.

Leaf chlorophyll and nitrogen content was evaluated on each of the leaves used, by measuring the mean of five readings from a portable chlorophyll meter (SPAD-502, Minolta, Japan).

Chlorophyll Fluorescence Analysis

Chlorophyll fluorescence was measured immediately after each gas exchange measurement using a fluorescence module (PAM-fluorometer 3055-FL, Walz) attached to the gas exchange measurement equipment. The steady-state fluorescence yield (F_s) was measured after registering the gas-exchange parameters. A saturating light pulse ($8000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ during 0.8 s) was applied to achieve the light-adapted maximum fluorescence (F_m'). The actual PSII photochemical efficiency (Φ_{PSII}) was determined as $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_s)/F_m'$.

Analysis of the Fluorescent Transient Using the JIP-Test

Chlorophyll *a* fluorescence transients were measured at 2 pm with a Handy PEA chlorophyll fluorometer (Hansatech Instruments, King's Lynn, Norfolk, United Kingdom) on the three types of leaves from five different plants at D0, D1, D2, D4, D7, and D9. For D1 plants, additional measurements were taken after 30, 60, and 90 min of increased light to observe the short-time fluorescence response kinetics. Leaves were dark-adapted for 20 min with a lightweight plastic leaf clip prior to measuring. The transients were induced by 1 s illumination with a LED array of six light-emitting diodes providing a fully saturating light intensity of $3000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ and homogeneous irradiation. The fluorescence intensity at 50 μs was considered as F_0 (Strasser and Strasser, 1995). The fast fluorescence kinetics (from F_0 to F_m , where F_0 and F_m were, respectively, the minimum and maximum measured chlorophyll fluorescence of PSII in the dark-adapted state) were recorded from 10 μs to 1 s. The maximum quantum yield of photosystem II (PSII), the ratio of variable fluorescence (F_v) to maximum fluorescence (F_m), (F_v/F_m), the performance index (PI), a plant vitality indicator (Strasser et al., 2000; Strauss et al., 2006) and their components (F_v/F_0 , RC/ABS which represents the ratio of reaction centers to the absorbance, $(1-V_j)/V_j$ where V_j is the relative variable fluorescence at time $J = 2$ ms) were calculated automatically. We also calculated the dissipated energy flux per PSII reaction center (DI_0/RC), an indicator of the importance of processes other than trapping.

Antioxidant Enzyme Activity and Lipid Oxidation Measurement

The fresh juvenile and mature leaves (F1 and F3) were ground in liquid nitrogen using a ball mill. The powder was homogenized in 4 ml of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8, containing 1 mM EDTA- Na_2 , 5 mM DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma), 15 mM β -mercaptoethanol and 10% (wt./vol.) polyclar AT (insoluble polyvinylpyrrolidone BDH) for all the tested enzymes. The homogenate was centrifuged at $15\,000 \times g$ for 15 min and the supernatant was stored at 4°C.

Ascorbate peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) activity was measured according to Nakano and Asada (1981) by monitoring the decrease in A_{285} at 25°C. The reaction mixture (3 ml) contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0), 0.16 mM ascorbate, 0.1 mM EDTA- Na_2 , 3 mM H_2O_2 and extract. The concentration of oxidized ascorbate was calculated by using an extinction coefficient of $2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. One unit of APX was defined as 1 mmol ml^{-1} ascorbate oxidized min^{-1} .

Glutathione reductase (GR; EC 1.6.4.2) activity was determined from the rate of NADPH oxidation as measured by the change in absorbance at 340 nm at 25°C as per Foyer and Halliwell (1976). The reaction mixture (3.0 ml) contained 100 mM tris buffer (pH 7.8), 2 mM EDTA- Na_2 , 50 μM NADPH, 0.5 mM GSSG and extract. GR activity was calculated using an extinction coefficient of $6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Monodehydroascorbate reductase (MDAR; EC 1.6.5.4) activity was determined spectrophotometrically by measuring

the reduction of absorbance at 340 nm according to the technique described by Begara-Morales et al. (2015).

The 1.0 ml assay mixtures contained 50 mM TRIS-HCl (pH 7.8), 0.2 mM NADH, 1 mM ascorbate, and the sample. The reaction was initiated by adding 0.2 U of ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3 from *Cucurbita*; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States), and the decrease in A_{340} due to NADH oxidation was monitored. One milliunit of activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 nmol NADH min^{-1} at 25°C.

Catalase (CAT; EC 1.11.1.6) activity was assayed as per Cakmak and Marschner (1992) in a mixture (3.0 ml) containing 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 6 mM H_2O_2 and extract. At 25°C, the decomposition of H_2O_2 was monitored at 240 nm. CAT activity was calculated using an extinction coefficient of $39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

To evaluate malondialdehyde (MDA) content, about 200 mg of powder was mixed with 1 ml of trichloroacetic acid (TCA 0.1%) and then centrifuged at 4°C for 15 min at $15\,000 \times g$. Some (0.5 ml) of the removed supernatant was supplemented with 1 ml of thiobarbituric acid (0.5% TBA prepared in 20% TCA) and incubated for 30 min in a water bath at 95°C before stopping the reaction by immediate cooling in crushed ice for 30 min. In order to avoid the appearance of bubbles in the tubes, each sample was transferred to a haemolysis tube and butanol was added to the same volume as the sample. The colored butanol phases were recovered and their absorbance measured at 532 and 600 nm. After Subtracting the non-specific absorbance read at 600 nm, the malondialdehyde concentration was calculated using its extinction coefficient ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

The water-soluble protein content of extracts was measured by Bradford's method (Bradford, 1976) using bovine serum albumin as a standard.

Sugar Metabolism

Sugars were extracted from 20 mg samples of freeze-dried powder and measured by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection (Dionex Chromatography Co.) as described by Dussert et al. (2006).

Starch content was determined on 30 mg of dry powder using the total starch kit GOPOD (D-glucose, K-Gluc, Megazyme International, Ireland). After elimination of soluble sugars and the soluble products of starch degradation, the residue was then hydrolysed into glucose units with α -amylase and amyloglucosidase successively. The D-glucose obtained was then degraded by a glucose oxidase and the hydrogen peroxide produced was quantified by spectrophotometry at 510 nm after a last enzymatic reaction. The results were expressed as a percentage of dry mass (% DW).

Analyses were carried out in triplicate by performing extractions on three independent plants.

Phenolic Extraction and Quantification

The freeze-dried plant material was ground in a ball mill (TissueLyser II, Qiagen) and extraction was carried out by stirring 25 mg of plant material in 6 mL of MeOH/ H_2O (80:20, v/v) for 3 h at 4°C (225 rpm, Rotamax 120, Heidolph). After centrifugation

(8 min, 3500 rpm), the methanol extract was collected and filtered (Millipore, 0.25 μm porosity) before analysis. Each extraction was carried out in triplicate. Each sample was characterized by its mean content of purine alkaloid (caffeine), HCE (CQAs, DiCQAs, FQAs), xanthone (mangiferin) and flavonoids ((+)-catechin, (–)-epicatechin, kaempferol, quercetin, and rutin), expressed as a percentage of dry weight. Quantification was carried out on 10 μL of extract using a HPLC system (Shimadzu LC 20, Japan) equipped with a photodiode array detector and consisting of an Eclipse XDB C18 (3.5 μm) column (100 mm \times 4.6 mm, Agilent). The elution system (0.6 mL min^{–1}) involved two filtered (0.2 μm pore size filter), sonicated and degassed solvents, namely solvents A (water/acetic acid, 98:2, v/v) and B (H₂O/MeOH/acetic acid, 5:90:5 v/v/v). The linear gradient was: 0 min, 15% solvent B; 0–4 min, 25%; 4–8 min, 32%; 8–10 min, 35%; 10–14 min, 58%; 14–16 min, 62%; 16–18 min, 64%; 18–21 min 80%; 21–24 min 15%; 24–26 min, isocratic.

The calibration curve was plotted using three replicate points of standard solutions of caffeine, mangiferin, 5-CQA, from Sigma-Aldrich Chimie (St Quentin Fallavier, France), glucosylated kaempferol and quercetin, rutin, (+)-catechin, (–)-epicatechin and epigallocatechin from Extrasynthese (Lyon, France) and 3,5-diCQA from Biopurify Phytochemicals (Chengdu, China) at 25, 50, 75, and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Identification was carried out by comparing spectra and retention times at 280, 320, and 360 nm (Supplementary Figure S4). Quantification of 3-, 4- and 5-CQA, FQAs and 3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA was undertaken at 320 nm, caffeine and catechin derivatives at 280 nm, and mangiferin, kaempferol and quercetin derivatives at 360 nm, by comparison with respective standards. The presence of compounds was confirmed by analyzing one sample of each type of leaf by LC-MS, according to the technique previously described (Campa et al., 2012).

Histochemical Analysis of Phenolic Compounds

Small pieces of freshly collected *Coffea* leaves were embedded in 3% agarose (type II EEO, Panreac) before cutting for histochemical examination. TS (40 μm) were obtained using a Leica VT 1000S vibrating blade microtome (frequency 7, speed 2). For mangiferin histolocalisation, TS were mounted in distilled water without any reagent. TS of specimens were viewed under a light microscope (Nikon Optiphot) with UV light (filter UV-1A: 365 nm excitation filter). Under these conditions, mangiferin exhibited strong yellow autofluorescence. Manual detachments of plant epidermis were carried out on abaxial epidermis to observe stomata before and after lighting to detect HCE. TS or epidermis detachments were directly mounted in DPBA reagent (2-aminoethyl diphenylborinate, Fluka). Under these conditions, HCEs were identified by greenish-white fluorescence and flavonoids (F) by yellow fluorescence, which could be reinforced using a specific filter B2a: 540 nm excitation filter (Mondolot-Cosson et al., 1997). Photographs were taken with a digital Nikon Coolpix 4500 camera. A microspectrofluorometer (Jobin-Yvon) equipped with an Olympus BX 60 microscope was used to obtain emission

fluorescence spectra from fresh leaf TS previously immersed in DPBA reagent. An area of 5 μm in diameter was selected in the orange area of epidermal cells. Each leaf was analyzed in triplicate. Using a xenon lamp and monochromators, 361.5–368.5 nm wavelengths were produced to excite compounds. The subsequent fluorescence was detected with a charge couple device (CCD) camera (Hyper HAD-Sony CCD 300) and the fluorescence emission spectra were produced by the SpectraMax software package. A standard of rutin (Acros Organics, United States) was tested at 0.2% (w/v) concentration in DPBA reagent.

Statistical Treatments

The results for leaf functional traits (maximum quantum efficiency of PSII) and metabolite content used to characterize leaf response to light increase were expressed as means ($n = 5$ biological replicates for chlorophyll fluorescence, $n = 3$ biological replicates extracted 3 times for compound analyses) \pm standard deviation (sd). The results for leaf functional traits were analyzed using the Statistica software package (7.1 version, United States) to examine response variation, which was tested using a one-way analysis of variance (ANOVA). Means were compared between harvesting dates for each foliage stage and between leaf stages for the same harvesting date. When the *F*-test was significant, a Newman-Keuls test was carried out to compare means.

RESULTS

The High Phenolic Content of Juvenile Leaves (F1) Decreases with Aging

The biochemical analysis confirmed that, whatever the developmental stage of the leaf, phenolics in the form of HCEs were particularly accumulated (Table 1). They were especially present in the form of 5-CQA (5-CQA) and 3,5-diCQA, at a concentration of 230 and 83 nmol mg^{–1} DW or 8.15 and 4.30% (mg/100 mg DW), respectively, in juvenile leaves (F1). Among the phenolics, mangiferin, a glucosylxanthone, and (–)-epicatechin, a flavonoid, also accumulated but less so (0.06 and 0.05 $\mu\text{mol mg}^{-1}$ DW, respectively). Unlike what has been observed in leaves of other plant species, flavonoids were poorly represented, quantitatively and qualitatively, in the coffee leaves studied here. Only two flavanols, (+)-catechin and (–)-epicatechin, and one flavonol, rutin (quercetin-3-*O*-rutinoside), were present up to levels detectable by HPLC. The purine alkaloid caffeine appeared as the second most accumulated compound, with a content of 130 nmol mg^{–1} DW in juvenile leaves. As already observed, phenolics and alkaloids were more concentrated in young leaves (F1) than in growing and mature ones (F2 and F3, respectively), except for two minor HCEs, 4-CQA and one FQA isomer, and one flavonoid, (+)-catechin (Table 1).

Histochemical observations of cross-sections in F1, F2 and F3 leaves, carried out before treatment, confirmed the rapid and marked decrease in mangiferin and HCE content during leaf development, especially observable in parenchyma cells (Figures 8A,C,E,G). Differences between F2 and F3 leaves were

TABLE 1 | Quantitative data for alkaloids (caffeine) and phenolics in *Coffea arabica* var. Naryellis leaves at different growth stages.

Leaf stage	Compounds ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ dry weight)												
	Alkaloids	Phenolics											
		HCE							Xanthoness		Flavonoids		
	Caffeine	5CQA	4CQA	FQA	3,4 Di	3,5 Di	4,5 Di	Total	Mangif.	Catechin	Epicat	Rutin	Total
1: Juvenile	130.0 a	230.2a	3.8a	0.9a	1.8a	83.3a	4.4a	324.4a	63.5a	15.9a	51.6a	0.3a	67.8a
2: Growing	91.7 b	148.1b	5.9a	1.7a	2.1a	16.1b	1.9ab	175.8b	21.0b	11.8a	37.1bc	0.1a	49.0b
3: Mature	73.6 c	83.9c	6.6a	2.5a	1.4a	4.2b	0.9bc	99.5c	17.1b	18.7a	25.3c	0.2a	44.2b

Values are expressed as $\mu\text{mole mg}^{-1}$ dry weight (DW) and correspond to the mean of three measurements from leaves of three different seedlings. Means followed by the same letter were not significantly different between leaf stage at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test). HCE, hydroxycinnamic acid esters, Mangif., mangiférine, Epicat, epicatechin. Total HCE represents the sum of 5- and 4-CQA, FQA and 3,4-, 3,5- and 4,5-diCQA and total flavonoids the sum of catechin derivatives and rutin.

undetectable by microscopy analysis. Consequently, F2 cross-sections are not presented here. HCEs, which accumulated in every cell type of juvenile leaf tissue (F1, **Figure 8E**), appeared to be specifically localized in the adaxial, abaxial epidermis and in the palisade parenchyma of growing F2 and mature F3 leaves (**Figure 8G**). Flavonoids were not observed whatever the leaf growth stage (**Figures 8E,G**).

Switching to More Intense Illumination has a Negative Impact on Photosynthesis for All Leaf Developmental Stages

The three leaf stages also significantly differed in their nitrogen and chlorophyll content, as indicated by 1.9- and 1.37-fold higher SPAD values, estimated on a per unit area basis, in mature (F3) leaves than in growing (F2) and juvenile (F1) ones, respectively (**Figure 1A**). Histochemical observations showed that chlorophyll distribution varied too: it was present in most cells of the parenchyma of growing and mature leaves (F2 and F3), and was more specifically observable in palisade parenchyma of juvenile (F1) leaves (**Figures 8A,B**).

When plants were subjected to light increase, chlorophyll content (estimated by SPAD values) tended to slightly decrease in each leaf type, especially over the first 2 days of increased light in F1 and F2 leaves, although the values did not show statistical differences for the same leaf development stage (**Figure 1A**). For F2 and F3 leaves, photosynthetic capacity (maximum assimilation at saturating light and CO_2 : A_{max}), net carbon dioxide assimilation (A_{net}) and stomatal conductance (g_s) drastically decreased over the first 7 days of higher illumination, and then increased on day 9 (**Figures 1B–D**). This effect was particularly noticeable in mature leaves (F3) in which all these variables were significantly lower (about twofold) after 7 days' exposure to higher illumination, reaching 5.92 and 2.02 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ CO_2 fixed, respectively for A_{max} and A_{net} , and 20 mmol $\text{H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ for g_s . It should be noted that, according to the A_{max} and A_{net} values, photosynthesis was slightly stimulated in F3 and F1 leaves on day 1 and 2, respectively, after light was increased. In the youngest leaves (F1), despite a non-significant 20% decrease in photosynthetic capacity after 7 days of light

increase, A_{net} and g_s increased up to day 4 (**Figures 1C,D**). A_{net} and g_s were substantially lower in F1 leaves when compared to the other leaves at the beginning of the observation period.

Switching to More Intense Illumination Results in Photodamage in Juvenile and Growing Leaves

Unlike mature (F3) leaves, juvenile and growing (F1 and F2) leaves clearly appeared to have been stressed, as indicated by the decrease in the PI and in F_v/F_m (**Figures 2A,D**). According to Adams et al. (2006), the small F_v/F_m decrease observed in mature leaves can be considered as photoprotection while the more substantial decreases in juvenile and growing leaves may indicate photodamage. PI is a multi-parametric expression of three independent steps contributing to photosynthesis, namely RC/ABS, F_v/F_0 and $(1-V_J)/V_J$. The reduction in PI was particularly found in the youngest leaves (F1) for which the values of the three independent variables were statistically different before (at day 0) and 7 days after increasing illumination (**Table 2**). In F1 and F2 leaves, the lower PI values were mainly attributable to a decrease in RC/ABS and F_v/F_0 . The decrease in RC/ABS reflected the down-regulation of PSII reaction centers, a well-known mechanism of leaf adaptation to light (Lu et al., 2001). The decrease in F_v/F_0 , amounting to 33.59 and 23.13%, respectively, in F1 and F2 leaves, exposed to higher light for 9 days, suggested a reduction in energy trapping probability, in the sense of the quantum yield of primary PSII photochemistry. The severe decrease in $(1-V_J)/V_J$ values observed in F1 leaves (and not preceded by a slight increase on the 1st day, as observed in F2 and F3 leaves) may be interpreted as the consequence of a reduced capacity to convert excitation energy into photosynthetic electron transport. On the other hand, the increase in DI_0/RC observed in F1 and F2 treated leaves showed that the rate of energy flux dissipation by processes other than trapping, such as heat dissipation, increased in these leaves (**Figure 2B**).

This increase in DI_0/RC suggests that F1 and F2 leaves were under greater pressure than F3 leaves exposed to higher light intensity. It does not tell us whether the dissipation of energy flux by processes other than trapping was effective in preventing overheating and damage to photosystems. The gradual increase in the initial value of the minimum fluorescence rate (F_0) in F1

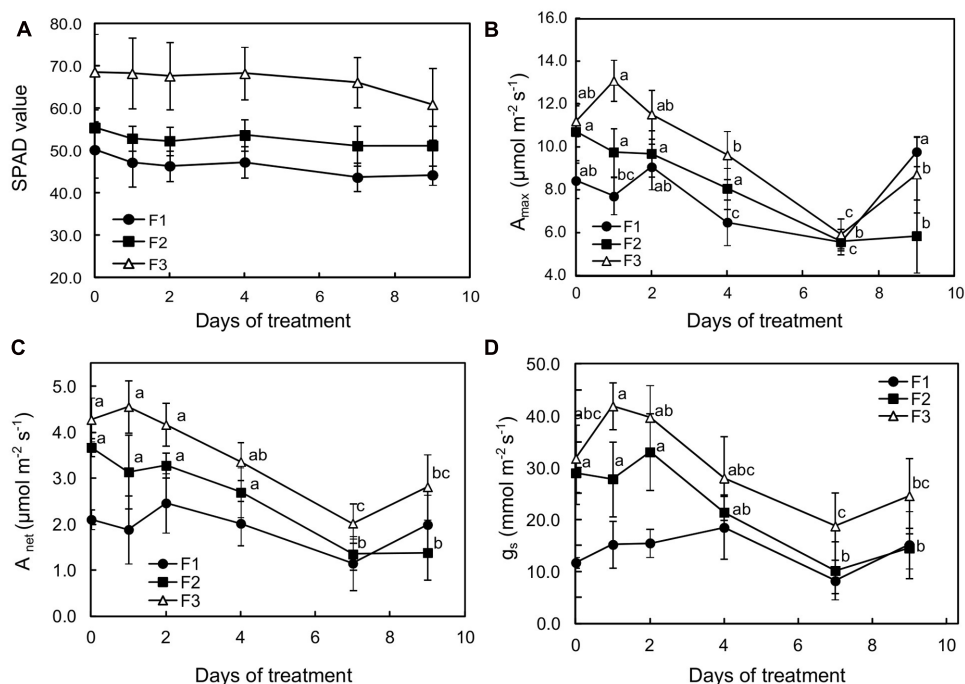


FIGURE 1 | Effects of illumination increase (PAR 300 to 500) on (A) SPAD values, (B) photosynthetic capacity (A_{max}), (C) net carbon dioxide assimilation, and (D) stomatal conductance (g_s) of juvenile (F1), growing (F2), and mature (F3) *Coffea arabica* leaves. Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 5$). Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman-Keuls test) among means for each leaf growing stage (absence of significant differences for SPAD values).

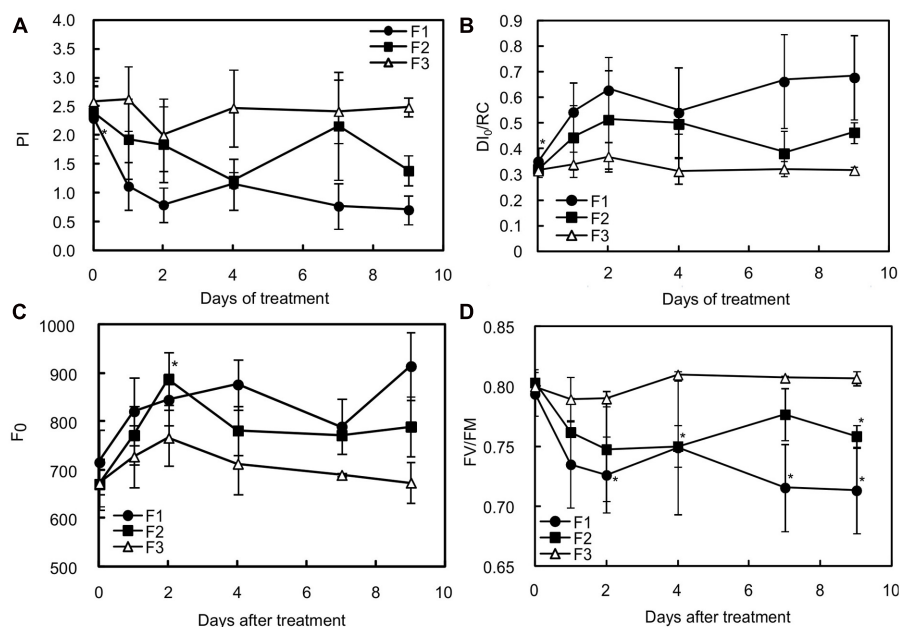


FIGURE 2 | Effects of illumination increase on different fluorescence parameters in juvenile (F1), growing (F2) and mature (F3) *C. arabica* leaves. (A) Represents the values of the performance index (PI), (B) the maximum quantum rate (F_V/F_M), (C) the non-photochemical energy dissipation per reaction center (D_0/RC), and (D) the minimum fluorescence level after dark acclimation (F_0). Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 5$). Significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman-Keuls test) among means for each leaf growing stage are noted only in juvenile (F1) and growing (F2) leaves and mentioned by an asterisk.

TABLE 2 | Effects of increased irradiance on the evolution of three fluorescence parameters contributing to the performance index value (PI) in *C. arabica* leaves at three different growing stages.

Time (days after treatment)	Juvenile leaf (F1)			Growing leaf (F2)			Mature leaf (F3)		
	RC/ABS	F_v/F_0	$(1-V_j)/V_j$	RC/ABS	F_v/F_0	$(1-V_j)/V_j$	RC/ABS	F_v/F_0	$(1-V_j)/V_j$
0	0.593a	3.873a	1.183a	0.617a	4.086a	1.132ab	0.643a	4.005a	1.211a
1	0.496bc	2.842b	0.915ab	0.569a	3.251ab	1.207ab	0.628a	3.776a	1.324a
2	0.444c	2.689b	0.773b	0.514a	3.032ab	1.381ab	0.576a	3.754a	1.086a
4	0.476c	3.135ab	0.925ab	0.527a	3.016b	0.935 b	0.619a	4.259a	1.110a
7	0.442c	2.610b	0.761b	0.592a	3.514ab	1.208ab	0.602a	4.176a	1.145a
9	0.429c	2.572b	0.751b	0.523a	3.141ab	1.005ab	0.612a	4.181a	1.166a

Data presented are means of 4 to 6 values. Different letters indicate significant differences between means from each type of leaf between sampling dates ($p \leq 0.05$, Newman-Keuls test).

and F2 leaves from 24 h of higher light exposure (**Figure 2C**) therefore suggests that all the triggered adaptive mechanisms were not enough to prevent the photosynthetic machinery from being damaged.

Switching to More Intense Illumination Drastically Affects Sugar Metabolism but Only Slightly Affects the Respiration Rate in Juvenile and Growing Leaves

Starch accumulation was observed at all leaf developmental stages as a consequence of the exposure to more intense illumination (**Figure 3A**). However, there were differences. The concentration in starch was the lowest in F3 leaves before the light flux increase, suggesting that export was more active than at the youngest development stage. Over the first 3 days of increased light, higher starch accumulation was observed in F1 and F2 leaves (2.95- and 1.91-fold higher, respectively) reflecting a greater need to deal with low exports. Throughout more intense light exposure, the starch content regularly increased in F3 leaves, amounting to around 1.5-fold higher than that of F1 and F2 leaves after 9 days of the experiment, as starch accumulation ceased in those leaves after 4 and 7 days, respectively.

A drastic increase in sucrose content was observed in all the leaves 1 day after exposure to higher light (1.43-, 1.63-, and 1.95-fold higher in F1, F2 and F3 leaves, respectively) (**Figure 3B**). The sucrose content then decreased rapidly in F3 and F2 leaves, reaching the value before light change from day 7 and from day 9, respectively. In F1 leaves, the decrease was only observed after 7 days of treatment and, after 9 days, the sucrose content remained 1.4-fold higher than before treatment. In mature leaves, the increase in starch accumulation and the decrease in sucrose content caused by increased light were accompanied by a clear decrease in glucose content (sevenfold less on day 9 than before treatment) and a return to the previous concentration in fructose after a drastic increase 1 day after treatment (Supplementary Figures S2A,B). Glucose, which was weakly accumulated in mature leaves, showed the highest concentrations before light increase, and fructose 1 day after exposure, reaching values of 0.61 and 0.44% DW, respectively. Interestingly, F3 leaves displayed a higher

fructose than glucose content, throughout the period of stress (Supplementary Figures S2A,B).

In juvenile (F1) and growing leaves (F2) leaves, fructose, and more especially glucose, contents markedly increased and amounted to less than 5% of the sucrose content (**Figure 3C**). In juvenile leaves, the glucose content (Supplementary Figure S2A) practically reached that of sucrose (4.06 and 4.45% DW, respectively). The hexose to sucrose ratio was higher in F1 and F2 leaves than in F3 leaves before exposure to higher light and the difference from mature F3 leaves greatly increased during the treatment (**Figure 3C**), reflecting durable and huge inhibition of sucrose biosynthesis, which reduced the photosynthetic capacity in the younger leaves.

As usually observed in leaves of evergreen or deciduous species (Villar et al., 1995), the dark respiration rate (R_d) decreased with increasing leaf age, being threefold lower in mature leaves than in the other two types on D0 of treatment (**Figure 4**). Increasing light was followed by a twofold increase in R_d for mature leaves (F3) and then the rate was maintained for 6 days. A moderate increase (not significant) was also observed in juvenile leaves (F1) from day 2 to day 7, while R_d was not affected in growing leaves (F2) until day seven. However, on day nine, a large increase in dark respiration was observed in all of the leaves.

Even in Mature Leaves, Switching to More Intense Illumination Slightly Modifies the Antioxidant Enzyme Activity

As an indicator of oxidative stress, the malondialdehyde content was evaluated in the three types of leaves (**Figure 5**). Surprisingly, the content in reactive species derived from lipid peroxidation slightly increased in F3 leaves with more intense illumination, while it decreased in F1 leaves, reaching the lowest value after 2 days (1.63-fold lower than before stress).

The activities of an antioxidant enzyme (catalase) and enzymes of the recycled oxidized forms of antioxidant such as glutathione and ascorbate [MDAR, APX, and GR] were evaluated in all the leaves, before and after treatment (**Figure 6**). Catalase, MDAR and GR activities were similar in juvenile (F1) and mature (F3) leaves before exposure to higher illumination. Only

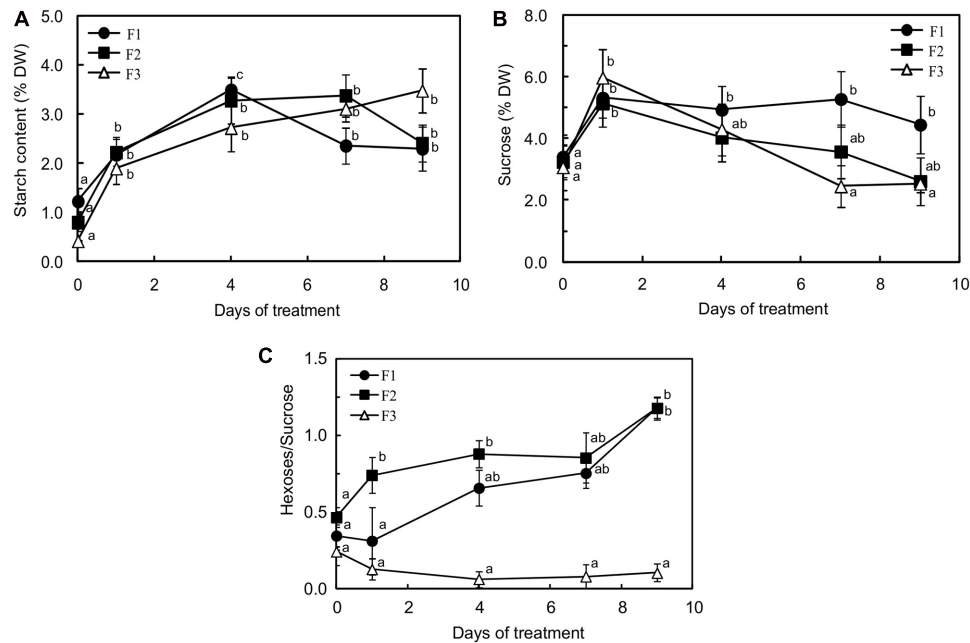


FIGURE 3 | Starch (A), sugar (B) content and changes in hexose/sucrose (C) in juvenile (F1), growing (F2) and mature (F3) *C. arabica* leaves subjected to an illumination increase (PAR 300 to 500) for 9 days. Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 5$). Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test) among means for each leaf growing stage.

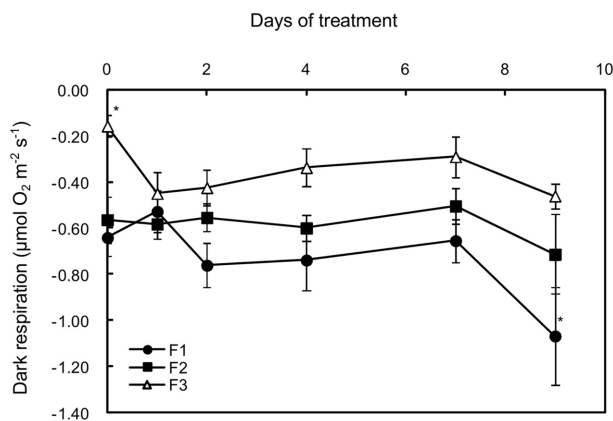


FIGURE 4 | Effects of illumination increase on the dark respiration rate (R_d) in juvenile (F1), growing (F2), and mature (F3) *C. arabica* leaves. Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 5$). Significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test) among means for each leaf growing stage are indicated by an asterisk.

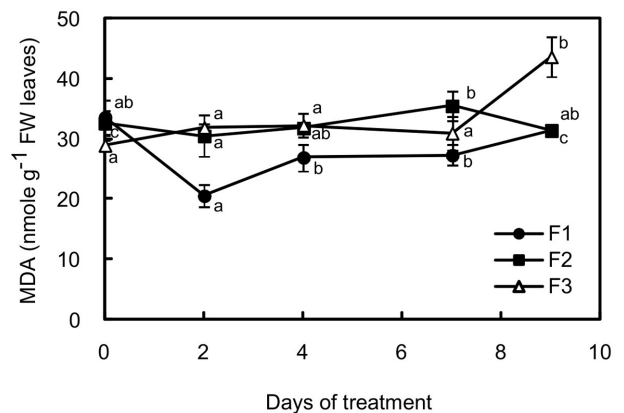


FIGURE 5 | Changes in malondialdehyde (MDA) content in juvenile (F1), growing (F2) and mature (F3) leaves of *C. arabica* plantlets subjected to an illumination increase (PAR 300 to 500) for 9 days. Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 5$). Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test) among means for each leaf growing stage.

APX activity was twice as high in mature leaves as in juvenile ones. Exposing plantlets to more intense illumination had a very low impact on enzyme activity, especially in F1 leaves. In F3 leaves, except after day 2 where a slight increase in MDAR activity was observed, increasing light even resulted in a decrease in enzyme activity. This effect was particularly marked for APX, whose activity was 1.7-fold lower after 7 days of higher light.

Switching to More Intense Illumination Induces a Rapid Increase in HCEs in Mature Leaves and Localized Synthesis of Flavonoids in Juvenile Leaves

Changes in caffeine and phenolic content were monitored after 1, 4, 7, and 9 days of higher light at the three leaf

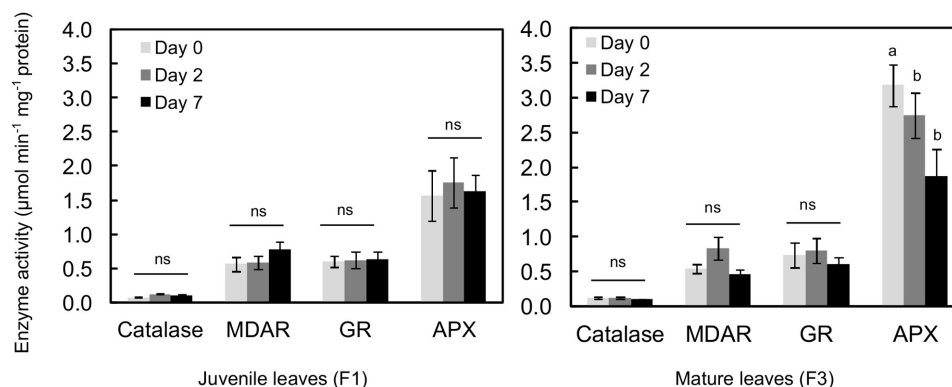


FIGURE 6 | Antioxidant enzyme activity in juvenile (F1) and mature (F3) leaves of *C. arabica* plantlets before and after 2 and 7 days of increased illumination (PAR 300 to 500). Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 3$ for catalase, 4 for APX and 6 for MDAR and GR). Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test) among means for each leaf growing stage. MDAR, monodehydroascorbate reductase; GR, glutathione reductase; APX, ascorbate peroxidase.

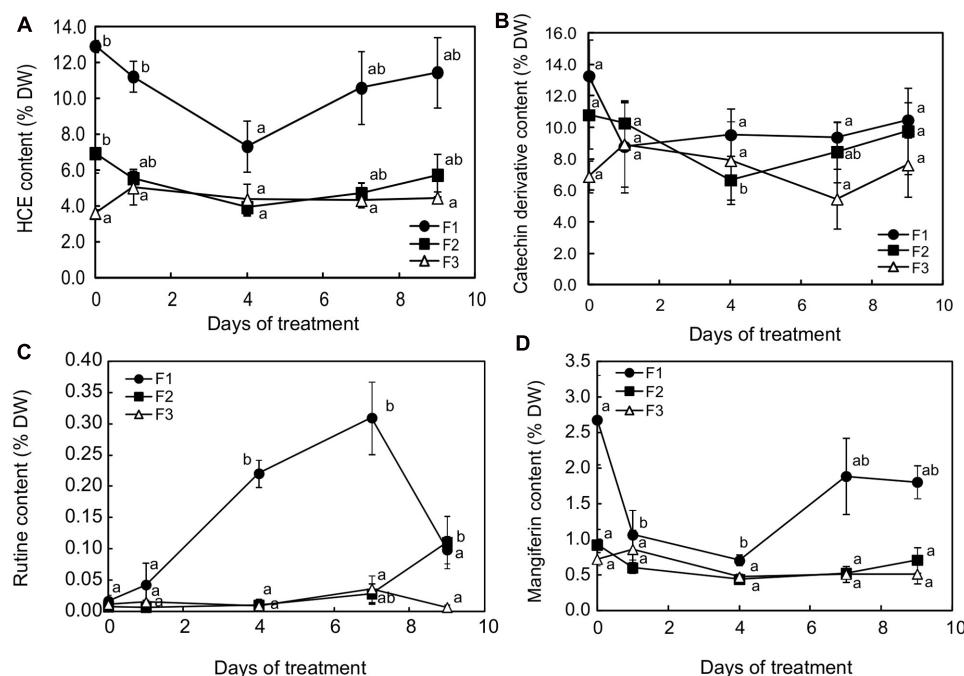


FIGURE 7 | Contents for (A) hydroxycinnamic esters (HCEs), (B) catechin derivatives, (C) rutin and (D) mangiferin in juvenile (F1), growing (F2) and mature (F3) leaves of *C. arabica* plantlets subjected to increased illumination during 9 days. Error bars represent \pm standard deviation of mean ($n = 3$) of two replicates. Different letters indicate significant differences at $p \leq 0.05$ (Newman–Keuls test) among means for each leaf growing stage.

stages. Whatever the leaf development stage, a modification in metabolite content was observed as early as 24h after light intensity increased (Supplementary Figure S3 and **Figure 7**). Caffeine, total catechin ((+)-catechin and (–)-epicatechin) and mangiferin content (Supplementary Figure S3 and **Figures 7B,D**, respectively) generally increased in F3 leaves and decreased in F1 and F2 leaves, so that all the leaf stages displayed almost similar contents for these compounds from day 1 to day 4. The phenomenon was particularly marked between F2 and F3 leaves,

which showed equivalent contents for caffeine, total catechin, rutin, HCEs and mangiferin throughout the exposure period, except after 4 days for the total catechin content and after 7 days for rutin (**Figures 7B,C**). The most marked response to higher light was observed in juvenile (F1) leaves, in which the HCE and mangiferin contents strongly decreased up to day 4 (**Figures 7A,D**) and rutin was highly accumulated from day 1 to day 7 (**Figure 7C**). After 4 days of more light increase treatment, 3,5-diCQA, a DiCQA, and mangiferin contents were fourfold

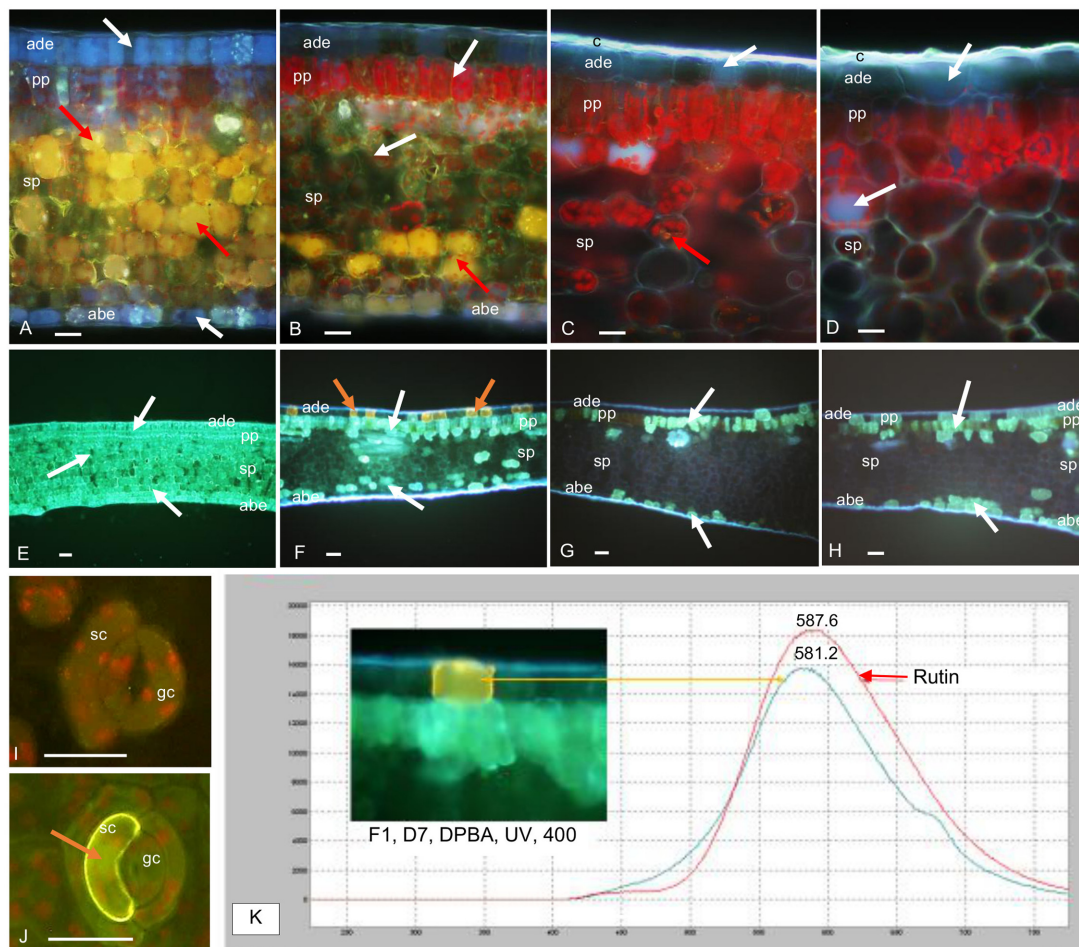


FIGURE 8 | Transversal sections of juvenile (F1) and mature (F3) *C. arabica* leaves before (D0) and after 7 days (D7) of increased illumination. **(A–D)** Mangiferin (M) and HCE distribution in F1 and F3 leaves at D0 and D7, mounted in distilled water, observed under UV light (365 nm), $\times 400$: **(A)** in F1 leaves at D0, M (bright yellow natural fluorescence, red arrows) is specifically concentrated in the vacuoles of spongy parenchyma (sp) cells. HCEs, (blue fluorescence, white arrows) are concentrated in adaxial (ade) and abaxial epidermal (abe) cells and in palisade (pp) and spongy parenchyma in which their natural blue fluorescence is masked by the strong yellow fluorescence of M. Chlorophyll red fluorescence is also attenuated by M and HCE fluorescences. **(B)** In F1 leaves at D7, M is only detectable in the sp cells (red arrows). The presence of HCEs is slightly visible in ade and abe cells. In pp, their natural fluorescence is masked by chlorophyll fluorescence. **(C)** In F3 leaves at D0, M is almost undetectable and HCEs appeared less concentrated than in F1 leaves (white arrows); the cuticle (c) is thick compared to that of F1 leaves. **(D)** In F3 leaves at D7, M is almost undetectable and HCEs appear as concentrated as at D0 (white arrows). **(E–H)** HCE and Flavonoid (F) distribution in F1 and F3 leaves at D0 and D7, mounted in DPBA, observed under UV light (365 nm), $\times 100$: **(E)** confirms the accumulation of HCEs (white arrows) in all the tissues of F1 leaves at D0. F are not detectable. **(F)** In F1 leaves at D7, HCEs are localized in some ade, abe and sp cells. They seem to be particularly accumulated in pp cells (white arrows). Some cells from ade present high flavonoid (F, orange arrows) concentration. **(G)** In F3 leaves at D0, HCEs only accumulate in very few ade cells, and in some pp and abe cells (white arrows), F are not detectable. **(H)** In F3 leaves at D7, HCEs seem distributed in more ade and abe cells compared to D0 (white arrows). **(I, J)** Flavonoid (F) distribution in abaxial epidermis and stomata cells of F1 leaves at D0 and D7, mounted in DPBA, observed under blue light (450–490 nm), $\times 400$: **(I)** at D0, F are almost undetectable in guard cells (gc) and subsidiary cells (sc) of the stomata. **(J)** at D7, a strong yellow fluorescence indicates Flavonoid accumulation in a sc (orange arrow). **(K)** Fluorescence emission spectra of an adaxial epidermal cell concentrated in F1 at D7, and rutin standard, obtained under excitation at 365 nm, in DPBA: maxima emission peaks are near each other (581.2 nm for cell content and 587.6 nm for rutin).

lower than initially (1.21 and 0.70% DW instead of 4.30 and 2.68% DW, respectively).

Microscopic observation of cross-sections of F1 leaves exposed to higher light for 7 days showed that the distribution of mangiferin and HCEs evolved differentially in leaf tissues after higher illumination (**Figure 8**). When mangiferin seemed almost to vanish from spongy parenchyma cells (**Figure 8B**), the HCE level mostly decreased in spongy parenchyma, and in

adaxial and abaxial epidermis cells (**Figure 8F**). Cells from abaxial and adaxial epidermis displayed yellow fluorescence under UV light in DPBA buffer, indicating flavonoid presence (**Figure 8F**). The fluorescence spectra emitted by these cells was analyzed by microspectrofluorometry and confirmed the presence of rutin (**Figure 8K**). Comparing abaxial epidermis under blue light in DPBA buffer before and after 7 days of higher light revealed that flavonoid-accumulating cells often corresponded to subsidiary

cells of closed stomata (Figures 8I,J). In F3 leaves, except for the presence of HCEs in numerous epidermis cells, leaves stressed for 7 days did not show any marked differences compared to that before the light increase (Figures 8D,H).

DISCUSSION

Mature Leaves Are Able to Cope with Increased Illumination, Arguably Because of Efficient Photosynthesis Associated with Effective Photoprotection

As already seen here, maintaining a high level of photosynthetic capacity for mature leaves (F3) over 7 days indicated that increasing light did not damage the photosynthetic machinery of those leaves. As highlighted by previous evaluations on *C. canephora* leaves (Netto et al., 2005), SPAD evaluations indicated that the photosynthetic pigment content was conserved and that nitrogen allocation, a key factor for the process of acclimation to intense light in coffee plants (Ramalho et al., 1997), was always effective. Moreover, the mature leaf contents for antioxidant compounds such as flavonoids and HCEs was not greatly modified, showing that higher light slightly triggered adaptive mechanisms, acting on the HCE and catechin isomer content. The HCE content increased after 24 h and was maintained at this level during application of the higher light regime. This increase in HCE content was exclusively due to a greater accumulation of two HCEs out of the six present in *C. arabica* leaves, 5-CQA and especially 3,5-DiCQA (data not shown). Their content was 1.3- and 2.6-fold higher after 1 day of increased light exposure, respectively. In mature leaves, fructose and sucrose contents were also the highest 24 h after exposure to light increase. Grace and Logan (2000) showed that feeding tomato plants (HCE accumulating plants) with sucrose led to an increase in chlorogenic acid (5-CQA) content in leaves, indicating that a high soluble sugar level stimulated carbon flow through the phenylpropanoid pathway, which leads to phenolic synthesis. The narrow relation between photosynthesis/carbon source and the phenylpropanoid pathway was demonstrated by a 20–50% decrease in HCE content in transformed tobacco plants underexpressing transketolase (20 to 40% less), an enzyme from the Calvin cycle (Henkes et al., 2001).

Microscopic observations revealed the presence of HCEs exclusively in epidermis and palisade parenchyma cells of mature leaves rather than systematic accumulation in all cells of the leaf blade in juvenile leaves. This specific distribution of antioxidant compounds in nearby tissues of the leaf surface suggests that cellular differentiation occurred during leaf aging. This helps to maintain on the leaf surface high proportions of chlorogenic acid and derivatives, potential scavengers of free radicals and other oxidative species generated by environmental stresses (intense light, low temperatures or pathogen infection). Grace and Logan (2000) considered that chlorogenic acid, in addition to its role of an alternative carbon sink under excess light conditions, may actively participate, as a potent hydrogen-donating antioxidant,

in photoprotection due to its ability to consume photochemical reduction power. In the event of light increase, its presence in the zone of active photosynthesis may help classic ROS (SOD, APX, MDAR or GR) in radical scavenging when their capacity is exceeded. By comparing *C. arabica* leaf metabolism between shaded and sunlit plants, Martins et al. (2014b) concluded that the priority for coffee plants is to adjust leaf metabolism to fight against oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield.

Another important modification observed in leaf phenolics concerned catechin derivatives, whose content in mature leaves decreased 3-fold between the beginning and day 7 of higher light exposure. By feeding *Arabidopsis* plantlets with (+)-catechin at different concentrations, Rani et al. (2011) found an accumulation of this compound in leaves, accompanied by an increase in water potential, leaf thickness, and stimulation of overall growth. Reducing leaf growth by strongly decreasing (+)-catechin concentration could be the response of mature leaves to higher light intensity. This is in accordance with classic observations of full-sun coffee plants that have more small leaves than shaded plants (Voltan et al., 1992).

Microscopy also revealed that, under a constant light regime (D0), only growing and mature leaves possessed a thick cuticle wax. This protective layer of adaxial and abaxial surfaces seemed to be set up during stress in juvenile leaves. Cuticle may be an additional protection in older leaves, limiting the intensification of water evaporation due to increased radiation. Nevertheless, our results showed that cuticle present in growing leaves was ineffective in protecting them from photodamage.

Mature Leaves Are Able to Cope with Higher Light Arguably Because of a Better Capacity to Export Sucrose and Use Alternative Pathways for Electron Bypass

Considering the parameters derived from the induction of maximum fluorescence, the behavior of F3 mature leaves was in sharp contrast with that of juvenile and growing leaves. Higher illumination did not damage the photosynthetic machinery of mature leaves and did not even trigger adaptive mechanisms such as heat dissipation. We put forward the hypothesis that there was no imbalance between the quantity of energy entering the mature leaves in the form of photon flux and the quantity of energy in the form of electron flux used by the Calvin cycle because the latter was not down-regulated by sugar accumulation (Azcon-Bieto et al., 1983; Stitt et al., 1990), unlike what happened in juvenile and growing leaves. In other words, mature leaves were able to maintain a greater ability to process NADPH, which prevented overheating of the photosynthetic machinery. This fact was displayed in mature leaves by the increase in the dark respiration rate from the 1st day of higher illumination and the following decrease in sugar content.

Numerous studies have shown the negative feedback effect of carbohydrate accumulation on leaf photosynthesis (Azcon-Bieto, 1983; Paul and Foyer, 2001; Paul and Pellny, 2003; Urban et al., 2004; Urban and Alphonsout, 2007). Increased photoinhibition

was found to be associated with low sink demand (Buwalda and Noga, 1994; Myers et al., 1999) and the existence of carbohydrate accumulation (Roden and Ball, 1996). Starch accumulation is a mechanism which prevents down-regulation of photosynthesis by providing an outlet for photosynthetic end-products when exports fail to evacuate them effectively. Consequently, starch accumulation can be considered as an indicator of sugar-export efficiency. In mature leaves, the continuous increase in starch content during the treatment, together with the ability to reduce the sucrose content to the level observed before light treatment, indicated excellent sugar-export efficiency. All these data indicated that mature leaves sustained the increased photosynthesis rate induced by higher illumination via starch synthesis and via sucrose export to other plant parts. In juvenile and growing leaves, starch accumulation seemed to cease after 7 and 4 days of higher illumination, respectively, and a high sucrose content was observed during the treatment. Moreover, hexoses accumulated substantially in these leaves, so that the hexose to sucrose ratio was more than twice as high after 9 days of higher illumination. In juvenile and growing leaves, increasing illumination seemed to inhibit sucrose biosynthesis and the subsequent hexose accumulation then reduced the photosynthetic capacity in the leaves.

In Juvenile and Growing Leaves, the Switch to Higher Illumination Affects PSII Centers Because of Weak NADPH Availability

In juvenile and mature leaves, a net decrease in photosynthesis capacity was found during increased illumination by evaluating the PI and F_v/F_m . As a multi-parametric variable integrating RC/ABS, F_v/F_0 and $(1-V_j)/V_j$, PI is a much more sensitive and discriminating stress indicator than F_v/F_m (Živčák et al., 2008). Its decrease is much more pronounced than the decrease in F_v/F_m . In PI, RC/ABS represents the contribution of the density of active reaction (in the sense of quinone acceptor (Q_A) reducing) centers (on a chlorophyll basis), F_v/F_0 represents the contribution to PI of light reactions for primary photochemistry, i.e., the performance due to trapping probability, and $(1-V_j)/V_j$ represents the contribution of dark reactions to PI, i.e., the performance due to the conversion of excitation energy into photosynthetic electron transport. Clearly, the lower PI values found in juvenile and growing leaves were attributable to a decrease in RC/ABS and F_v/F_0 . The decrease in RC/ABS in these leaves reflected the down-regulation of PSII reaction centers, a well-known mechanism of light adaptation in leaves (Lu et al., 2001). The 33.59 and 23.13% decrease in F_v/F_0 , respectively, in F1 and F2 leaves exposed to more intense light for 9 days, suggests that energy trapping probability, in the sense of the quantum yield of primary PSII photochemistry, was indeed reduced. The decrease in $(1-V_j)/V_j$ values observed in juvenile leaves exposed to increased light may be interpreted as the consequence of a reduced ability to process NADPH, which would impair electron transport capacity at the PSII acceptor side. The PI reduction was particularly noticeable in juvenile leaves, for which the values of the three parameters were statistically different before (day 0) and

7 days after increasing illumination. In many plants, such as sugar beet (Fondy and Geiger, 1982) or *Arabidopsis* (Trethewey and Rees, 1994), dark respiration just after the photoperiod reaches around 50% higher than that of the end of the dark period, due to a greater abundance of hexose and NADPH. The weak increase in dark respiration rate observed in juvenile leaves (or lack of increase in growing leaves) may indicate a higher NADPH consumption rate in these growing organs, indicating weaker NADPH availability attributable to more intense growth.

The adaptive mechanisms triggered by exposure to increased light (down-regulation of energy trapping and conversion, rerouting of electron fluxes and dissipation of excess energy in the form of heat) prove to be insufficient in preventing the photosynthetic machinery from being damaged in juvenile and growing leaves. From 24 h of high light exposure, the initial value of fluorescence F_0 was gradually higher. F_0 is the level of fluorescence emission when all the primary quinone acceptors Q_A are in the oxidized state. An increase in F_0 is believed to be caused by the release of free chlorophyll from protein-pigment complexes, which results in blocked energy transfer to the PSII traps (Armond et al., 1980; Sundby et al., 1986; Urban and Alphonsout, 2007). An increase in F_0 may not be reflected in a decrease in F_v/F_m when there is a concomitant decrease in F_m , which was not the case. Our observations regarding F_0 suggest that the stress associated with the light increase led to photodamage, which is consistent with the previously described effects of severe stress in other plants. For instance, drought stress was observed to induce a loss of the D1 and D2 proteins that constitute the heterodimer core of PSII (He et al., 1995). Taken together, our observations strongly suggest that F2 leaves, and even more so F1 leaves, were not able to cope with higher light, as F3 leaves did, and that some down-regulation and even damage occurred to PSII centers.

Increased Illumination Affects Growing Leaves due to Inefficient Carbon Metabolism and Weak Photoprotection

Unlike mature leaves, juvenile and growing leaves clearly appeared to have been stressed, as indicated by the PI, to the point of suffering photodamage. Surprisingly, despite tissue organization comparable to that of mature leaves, growing leaves demonstrated high sensitivity to slight light increase. Moreover, the biochemical analysis focusing on phenolics was unable to show differences in HCE and mangiferin content between growing and mature leaves throughout the period of higher light application. Only a late modification in flavonoid content – a severe decrease in (+)-catechin content and a slight increase in rutin content 4 and 7 days after the beginning of increasing light, respectively – contributed to the major differences between growing and mature leaves concerning phenolics. The most significant differences were noted in the carbon metabolism. Growing leaves showed the greatest accumulations of glucose, fructose and starch during the first 7 days of light increase. With a hexose/sucrose rate between 1.5- and 2.5-fold higher than in mature leaves during stress, growing leaves demonstrated an incapacity to convert hexoses, which were

found at concentrations that could be toxic for cells (Couée et al., 2006). As end products of photosynthesis, sugars may play a central role in modulating the expression of photosynthesis genes and then in the light acclimation process in growing coffee leaves (Hausler et al., 2014), even though, in mature leaves, inhibition of photosynthesis cannot be attributable to feedback inhibition by carbohydrates (Batista et al., 2012).

Rutin Accumulation Induced by Increased Illumination in Juvenile Leaf Epidermis Is Too Localized to Offer Effective Photoprotection

Compared to older leaves, glucose and fructose greatly and regularly accumulated in juvenile leaves throughout the treatment and juvenile leaves seemed to be less able to export sucrose. The response of juvenile leaves to higher light was also characterized by a decrease in catechin isomers and mangiferin content and a drastically increased amount of rutin, a UV-absorbing flavonoid. As in growing leaves, a decrease in HCE content was also observed, primarily in adaxial epidermis cells and in spongy parenchyma cells, as indicated by microscopic observations, revealing a loss in leaf antioxidant protection. Rutin synthesis was only found in juvenile leaves and was concentrated in some adaxial epidermis cells and in subsidiary cells of some stomata. In cotton leaves, the accumulation of UV-absorbing flavonoids in epidermal cells has been observed in response to biotic stress (Edwards et al., 2008). Flavonoids, which are produced during the hypersensitive resistant response to *Xanthomonas campestris*, were localized in epidermal cells surrounding bacterial infection sites and protected the living mesophyll cells that surrounded the dead cell cluster from the sunlight-dependent toxicity of the phytoalexins synthesized during the plant response. As in cotton, rutin in juvenile coffee leaves may play the role of a UV screen, but as a chloroplast protectant, more specifically when localized inside the chloroplast. Both *in vitro* and *in vivo* studies have shown that the presence of flavonol glycosides in chloroplasts delays thylakoid lipid peroxidation and correlates negatively with the singlet oxygen level (Takahama and Oniki, 1997; Vanderauwera et al., 2005). Juvenile leaves seemed to respond to high-light stress by a remobilization of phenylpropanoid metabolites for the synthesis of the most active flavonoids to protect the photosynthetic system. These compounds have been considered as a sink for reduced carbon and they may constitute, better than other phenolics, an energy escape valve by consuming triose phosphate, ATP and NADPH (Grace and Logan, 2000; Hernandez and Van Breusegem, 2010). However, unlike what can be observed in *Erigeron breviscapus*, this protection is not efficient in young coffee leaves (Zhou et al., 2016).

CONCLUSION

This study showed the limited ability of juvenile leaves to adapt from low to higher light intensity. The present findings obtained

in growth chamber conditions are original because, until now, very few works have evidenced contrasted behaviors of leaves according to their developmental stage. They indicate that the lack of acclimation ability of juvenile leaves against stronger lighting could be attributed to ineffective protection. Despite a different response of mature leaves that reflects the acquisition of adaptability during leaf development, the inability of juvenile coffee leaves to develop a useful defense against increased light after initial acclimation to low light clearly emphasizes the understorey origin of the coffee plants. Since most coffee plants are grown under full sunlight, current studies are developed in field conditions to deeply understand ecophysiological and molecular mechanisms involved in coffee tree acclimation to shade culture.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CC, HE, LM, and LU participated in the design of the study. J-CB and LT helped CC performing plant cultivation, measurements and sample harvest in growth chamber. DF and SR realized the measurements related to photosynthesis and interpreted the photosynthesis results with LU, CC, and LB. YL and JA performed the evaluation of antioxidant activity and participated to the data analysis. SD, with the help of CL, performed the sugar content analysis. CC and CL, helped by SD, performed starch and secondary metabolite extraction and quantification, LM and PLF performed microscopic analysis, and CC, HE, LB, and BB contributed to their interpretation. CC, LU, and HE wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was fully supported by CIRAD and IRD funds.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to address special thanks to Christian Chaine and Rémy Michel, technicians at Cirad, for their technical support, their kindness and their precious advice for the cultivation of coffee trees, and also to Ines Bellil, assistant professor at Constantine University (Algeria), which provided a first series of HandyPEA measurements and realized the first extractions for phenolic quantification.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01126/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Adams, W. W. A., Zarter, C. R., Mueh, K. E., Amiard, V., and Demmig-Adams, B. (2006). "Energy dissipation and photoinhibition: a continuum of photoprotection," in *Photoprotection, Photoinhibition, Gene Regulation, and Environment. Advances in Photosynthesis and Respiration*, Vol. 22, eds B. Demmig-Adams, W. W. I. I. Adams, and A. K. Mattoo (Dordrecht: Springer), 49–64. doi: 10.1007/1-4020-3579-9_5
- Alves, G. S. C., Torres, L. F., Déchamp, E., Breitler, J.-C., Joët, T., and Gatineau, F. (in press). Differential fine tuning of gene expression regulation in coffee leaves by CcDREB1D promoter haplotypes under water deficit. *J. Exp. Bot.* 11.
- Araujo, W. L., Dias, P. C., Moraes, G. A. B. K., Celin, E. F., Cunha, R. L., Barros, R. S., et al. (2008). Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. *Plant Physiol. Biochem.* 46, 884–890. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.05.005
- Armond, P. A., Bjorkman, O., and Staehelin, L. A. (1980). Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes - a manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 433–442. doi: 10.1016/0005-2736(80)90547-7
- Azcon-Bieto, J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant Physiol.* 73, 681–686. doi: 10.1104/pp.73.3.681
- Azcon-Bieto, J., Lambers, H., and Day, D. A. (1983). Effect of photosynthesis and carbohydrate status on respiratory rates and the involvement of the alternative path in leaf respiration. *Plant Physiol.* 72, 598–603. doi: 10.1104/pp.72.3.598
- Batista, K. D., Araújo, W. L., Antunes, W. C., Cavatte, P. C., Moraes, G. A. B. K., Martins, S. C. V., et al. (2012). Photosynthetic limitations in coffee plants are chiefly governed by diffusive factors. *Trees* 26, 459–468. doi: 10.1007/s00468-011-0606-2
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Valderrama, R., Padilla, M. N., et al. (2015). Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 66, 5983–5996. doi: 10.1093/jxb/erv306
- Bidel, L. P. R., Chomicik, G., Bonini, F., Mondolot, L., Soulé, J., Coumans, M., et al. (2015). Dynamics of flavonol accumulation in leaf tissues under different UV-B regimes in *Centella asiatica* (Apiaceae). *Planta* 242, 545–559. doi: 10.1007/s00425-015-2291-7
- Bidel, L. P. R., Meyer, S., Goulas, Y., Cadot, Y., and Cerovic, Z. G. (2007). Responses of epidermal phenolic compounds to light acclimation: in vivo qualitative and quantitative assessment using chlorophyll fluorescence excitation spectra in leaves of three woody species. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 88, 163–179. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2007.06.002
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Buwalda, J. G., and Noga, G. (1994). Intra-plant differences in leaf chlorophyll fluorescence parameters in perennial fruiting plants. *N. Z. J. Crop Hort. Sci.* 22, 373–380. doi: 10.1080/01140671.1994.9513848
- Cakmak, I., and Marschner, H. (1992). Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiol.* 98, 1222–1227. doi: 10.1104/pp.98.4.1222
- Campa, C., Mondolot, L., Rakotondraivo, A., Bidel, L. P. R., Gargadennec, A., Couturon, E., et al. (2012). A survey of mangiferin and hydroxycinnamic acid ester accumulation in coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. *Ann. Bot.* 110, 595–613. doi: 10.1093/aob/mcs119
- Chaves, A. R. M., Ten-Caten, A., Pinheiro, H. A., Ribeiro, A., and DaMatta, F. (2008). Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. *Trees* 22, 351–361. doi: 10.1007/s00468-007-0190-7
- Close, D. C., and McArthur, C. (2002). Rethinking the role of many plant phenolics - protection from photodamage not herbivores? *Oikos* 99, 166–172. doi: 10.1034/j.1600-0706.2002.990117.x
- Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., and El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57, 449–459. doi: 10.1093/jxb/erj027
- Da Matta, F. M. (2004). Ecophysiological constraints on the production of shaded and unshaded coffee: a review. *Field Crops Res.* 86, 99–114. doi: 10.1016/j.fcr.2003.09.001
- Day, T. A. (1993). Relating UV-B radiation screening effectiveness of foliage to absorbing-compound concentration and anatomical characteristics in a diverse group of plants. *Oecologia* 95, 542–550. doi: 10.1007/BF00317439
- Dussert, S., Davey, M. W., Laffargue, A., Doubeau, S., Swennen, R., and Etienne, H. (2006). Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiol. Plant.* 127, 192–204. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00666.x
- Edwards, W. R., Hall, J. A., Rowan, A. R., Schneider-Barfield, T., Sun, T. J., Patil, M. A., et al. (2008). Light filtering by epidermal flavonoids during the resistant response of cotton to *Xanthomonas* protects leaf tissue from light-dependent phytoalexin toxicity. *Phytochemistry* 69, 2320–2328. doi: 10.1016/j.phytochem.2008.05.021
- Fahl, J. I., Carelli, M. L., Vega, J., and Magalhaes, A. C. (1994). Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants (*Coffea arabica* L.). *J. Hort. Sci.* 69, 161–169. doi: 10.1080/14620316.1994.11515262
- Fondy, B. R., and Geiger, D. R. (1982). Diurnal pattern of translocation and carbohydrate metabolism in source leaves of *Beta vulgaris* L. *Plant Physiol.* 70, 671–676. doi: 10.1104/pp.70.3.671
- Foyer, C. H., and Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbate acid metabolism. *Planta* 133, 21–25. doi: 10.1007/BF00386001
- Grace, S. C., and Logan, B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 355, 1499–1510. doi: 10.1098/rstb.2000.0710
- Grace, S. C., Logan, B. A., and Adams, W. W. III. (1998). Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant Cell Environ.* 21, 513–521. doi: 10.1046/j.1365-3040.1998.00282.x
- Hausler, R. E., Heinrichs, L., Schmitz, J., and Flugge, U.-I. (2014). How sugars might coordinate chloroplast and nuclear gene expression during acclimation to high light intensities. *Mol. Plant* 7, 1121–1137. doi: 10.1093/mp/ssu064
- He, J. X., Wang, J., and Liang, H. G. (1995). Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiol. Plant.* 93, 771–777. doi: 10.1111/j.1399-3054.1995.tb05130.x
- Henkes, S., Sonnewald, U., Badur, R., Flachmann, R., and Stitt, M. (2001). A small decrease of plastid transketolase activity in antisense tobacco transformants has dramatic effects on photosynthesis and phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 13, 535–551. doi: 10.1105/tpc.13.3.535
- Hernandez, I., and Van Breusegem, F. (2010). Opinion on the possible role of flavonoids as energy escape valves: novel tools for nature's Swiss army knife? *Plant Sci.* 179, 297–301. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.06.001
- Ingersoll, C. M., Niesenbaum, R. A., Weigle, C. E., and Lehman, J. H. (2010). Total phenolics and individual phenolic acids vary with light environment in *Lindera benzoin*. *Botany* 88, 1007–1010. doi: 10.1139/B10-072
- Islam, M. S., Yoshimoto, M., Ishiguro, K., Okuno, S., and Yamakawa, O. (2003). Effect of artificial shading and temperature on radical scavenging activity and polyphenolic composition in sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 128, 182–187.
- Jansen, M. A. K. (2002). Ultraviolet-B radiation effects on plants: induction of morphogenic responses. *Physiol. Plant.* 116, 423–429. doi: 10.1034/j.1399-3054.2002.1160319.x
- Klein, P., Murray, S., Solano, W., Montagnon, C., Schilling, T., and Bertrand, B. (2016). "An extensive study on the genetic diversity of Arabica species evidences two genetic groups in Ethiopia and a sub-group in Yemen" in *Proceedings of the 26th International Conference on Coffee Science*, Kunming, 13–19.
- Lu, C., Zhang, J., Zhang, Q., Li, L., and Kuang, T. (2001). Modification of photosystem II photochemistry in nitrogen deficient maize and wheat plants. *J. Plant Physiol.* 158, 1423–1430. doi: 10.1078/0176-1617-00501
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkin, Y., Dixon, R. A., and Lamb, C. J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of performed phenylpropanoid products. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 7802–7806. doi: 10.1073/pnas.91.16.7802
- Mahesh, V., Million-Rousseau, R., Ullmann, P., Chabrilange, N., Bustamante, J., Mondolot, L., et al. (2007). Functional characterization of two p-coumaroyl ester 3'-hydroxylase genes from coffee tree: evidence of a candidate for chlorogenic acid biosynthesis. *Plant Mol. Biol.* 64, 145–159. doi: 10.1007/s11103-007-9141-3

- Martins, S. C. V., Araujo, W. L., Tohge, T., Fernie, A. R., and DaMatta, F. M. (2014a). In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. *PLoS ONE* 9:e94862. doi: 10.1371/journal.pone.0094862
- Martins, S. C. V., Galmés, J., Cavatte, P. C., Pereira, L. F., Ventrella, M. C., and DaMatta, F. M. (2014b). Understanding the low photosynthetic rates of sun and shade coffee leaves: bridging the gap on the relative roles of hydraulic, diffusive and biochemical constraints to photosynthesis. *PLoS ONE* 9:e95571. doi: 10.1371/journal.pone.0095571
- Mole, S., Ross, J. A., and Waterman, P. G. (1988). Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rainforest plants. I. Chemical changes. *J. Chem. Ecol.* 14, 1–21. doi: 10.1007/BF01022527
- Mondolot-Cosson, L., Andary, C., Guang-Hui, D., and Roussel, J. L. (1997). Histolocalisation de substances phénoliques intervenant lors d'interactions plante-pathogène chez le Tournesol et la Vigne. *Acta Bot. Gallica* 144, 353–362. doi: 10.1080/12538078.1997.10515380
- Müller-Xing, R., Xing, Q., and Goodrich, J. (2014). Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants. *Front. Plant Sci.* 5:474. doi: 10.3389/fpls.2014.00474
- Munekage, Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., Tasaka, M., et al. (2004). Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429, 579–582. doi: 10.1038/nature02598
- Myers, D. A., Thomas, R. B., and Delucia, E. H. (1999). Photosynthetic responses of loblolly pine (*Pinus taeda*) needles to experimental reduction in sink demand. *Tree Physiol.* 19, 235–242. doi: 10.1093/treephys/19.4.5.235
- Nakano, Y., and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide as scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 2, 867–880.
- Netto, A. T., Campostolini, E., Gonc, J., de Oliveira, J. G., and Bressan-Smith, R. E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Sci. Hortic.* 104, 199–209. doi: 10.1016/j.scienta.2004.08.013
- Nguyen, Q. T., Kozai, T., Niu, G., and Nguyen, U. V. (1998). Photosynthetic characteristics of coffee (*Coffea arabusta*) plantlets in vitro in response to different CO₂ concentrations and light intensities. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 55, 133–139. doi: 10.1023/A:1006224026639
- Nunes, M. A., Ramalho, J. C., and Dias, M. A. (1993). Effect of nitrogen supply on the photosynthetic performance of leaves from coffee plants exposed to bright light. *J. Exp. Bot.* 44, 893–899. doi: 10.1093/jxb/44.5.893
- Paul, M. J., and Foyer, C. H. (2001). Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52, 1383–1400. doi: 10.1093/jxb/52.360.1383
- Paul, M. J., and Pellny, T. K. (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *J. Exp. Bot.* 54, 539–547. doi: 10.1093/jxb/erg052
- Ramalho, J. C., Pons, T. L., Groeneweld, H. W., Azinheira, H. G., and Nunes, M. A. (2000). Photosynthetic acclimation to high light conditions in mature leaves of *Coffea arabica* L: role of xanthophylls, quenching mechanisms and nitrogen nutrition. *Austr. J. Plant Physiol.* 27, 43–51.
- Ramalho, J. C., Pons, T. L., Groeneweld, H. W., and Nunes, M. A. (1997). Photosynthetic responses of *Coffea arabica* leaves to a short-term high light exposure in relation to N availability. *Physiol. Plant.* 101, 229–239. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01841.x
- Rani, A., Kumar Vats, S., Sharma, M., and Kumar, S. (2011). Catechin promotes growth of *Arabidopsis thaliana* with concomitant changes in vascular system, photosynthesis and hormone content. *Biol. Plant.* 55, 779–782. doi: 10.1007/s10535-011-0187-3
- Robson, T. M., Klem, K., Urban, O., and Jansen, M. A. K. (2015). Re-interpreting plant morphological responses to UV-B radiation. *Plant Cell Environ.* 38, 856–866. doi: 10.1111/pce.12374
- Roden, J. S., and Ball, M. C. (1996). The effect of elevated [CO₂] on growth and photosynthesis of two Eucalyptus species exposed to high temperatures and water deficits. *Plant Physiol.* 111, 909–919. doi: 10.1104/pp.111.3.909
- Stitt, M., von Schaewen, A., and Willmitzer, L. (1990). "Sink" regulation of photosynthetic metabolism in transgenic plants expressing yeast invertase in their cell wall involves a decrease of the Calvin-cycle enzymes and an increase in glycolytic enzymes. *Planta* 183, 40–50. doi: 10.1007/BF00197565
- Strasser, B. J., and Strasser, R. J. (1995). "Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test," in *Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress, Photosynthesis: From Light to Biosphere. Montpellier, France, 20–25 August 1995*, ed. P. Mathis (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers), 977–980. doi: 10.1007/978-94-009-0173-5_1142
- Strasser, R. J., Srivastava, A., and Tsimilli-Michael, M. (2000). "The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples," in *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, eds M. Yunus, U. Pathre, and P. Mohanty (London: Taylor and Francis), 445–483.
- Strauss, A. J., Kruger, G. H. J., Strasser, R. J., and Van Heerden, P. D. R. (2006). Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by chlorophyll a fluorescence transient O-J-I-P. *Environ. Exp. Bot.* 56, 147–157. doi: 10.1016/j.envexpbot.2005.01.011
- Sundby, C., Melis, A., Maenpää, P., and Andersson, B. (1986). Temperature-dependent changes in the antenna size of photosystem II. Reversible conversion of photosystem IIa to photosystem IIb. *Biochim. Biophys. Acta* 851, 475–483. doi: 10.1016/0005-2728(86)90084-8
- Takahama, U., and Oniki, T. (1997). A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol. Plant.* 101, 845–852. doi: 10.1111/j.1399-3054.1997.tb01072.x
- Tegelberg, R., Julkunen-Tiitto, R., and Aphalo, P. J. (2004). Red : far-red ratio and UV-B radiation: their effects on leaf phenolics and growth of silver birch seedlings. *Plant Cell Environ.* 27, 1005–1013. doi: 10.1111/j.1365-3040.2004.01205.x
- Thioune, E.-H., McCarthy, J., Gallagher, T., and Osborne, B. (2017). A humidity shock leads to rapid, temperature dependent changes in coffee leaf physiology and gene expression. *Tree Physiol.* 37, 1–13. doi: 10.1093/treephys/tpw129
- Trethewey, R. N., and Rees, T. (1994). The role of the hexose transporter in the chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L. *Planta* 195, 168–174. doi: 10.1007/BF00199675
- Urban, L., and Alphonsout, L. (2007). Girdling decreases photosynthetic electron fluxes and induces sustained photoprotection in mango leaves. *Tree Physiol.* 27, 345–352. doi: 10.1093/treephys/27.3.345
- Urban, L., Léchaudel, M., and Lu, P. (2004). Effect of fruit load and girdling on leaf photosynthesis in *Mangifera indica* L. *J. Exp. Bot.* 55, 2075–2085. doi: 10.1093/jxb/erh220
- Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Griseem, W., et al. (2005). Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiol.* 139, 806–821. doi: 10.1104/pp.105.065896
- Villar, R., Held, A. A., and Merino, J. (1995). Dark leaf respiration in light and darkness of an evergreen and a deciduous plant species. *Plant Physiol.* 107, 421–427. doi: 10.1104/pp.107.2.421
- Volcan, R. B. Q., Fahl, J. I., and Carelli, M. L. C. (1992). Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 4, 99–105.
- Waterman, P. G., Ross, J. A. M., and McKey, D. B. (1984). Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility, and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). *J. Chem. Ecol.* 10, 387–401. doi: 10.1007/BF00988087
- Zhou, R., Su, W. H., Zhang, G. F., Zhang, Y. N., and Guo, X. R. (2016). Relationship between flavonoids and photoprotection in shade-developed *Erigeron breviscapus* transferred to sunlight. *Photosynthetica* 54, 201–209. doi: 10.1007/s11099-016-0074-4
- Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., and Slamka, P. (2008). Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ.* 54, 133–139.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Campa, Urban, Mondolot, Fabre, Roques, Lizzi, Aarrouf, Doubeau, Bretiler, Letrez, Toniutti, Bertrand, La Fisca, Bidel and Etienne. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Le revenu de millions de personnes et la balance commerciale de nombreux pays du Sud dépendent des exportations de café. La rouille orangée (*Hemileia vastatrix*) est considérée comme la maladie la plus dévastatrice pour cette culture. Elle attaque les feuilles du caféier et cause de fortes défoliations, à l'origine de pertes de rendement conséquentes. La résistance spécifique des variétés modernes, basée sur des mécanismes de résistance gène pour gène, est progressivement contournée. Le choix de variétés sensibles mais suffisamment vigoureuses pour limiter l'incidence de la maladie apparaît comme une alternative. Nous cherchons à comprendre comment les facteurs génotypiques et environnementaux influencent le développement de la maladie. En conditions contrôlées, nous avons évalué l'effet de la température, de l'ombrage, de l'apport azoté et de la vigueur hybride sur la pathogenèse du champignon. Après avoir établi l'importance des conditions de culture et de la vigueur hybride sur le développement du pathogène, nous avons abordé les bases moléculaires de la vigueur hybride chez le caféier Arabica, puis nous avons développé une méthode originale pour identifier des gènes candidats qui confèrent une plus grande résistance basale aux hybrides. Quels que soient les conditions agronomiques et le régime thermique, les hybrides sont moins sensibles que la variété lignée. A la plus forte température, un excès de lumière associé à de faibles apports d'azote aboutit à une très forte quantité de spores 43 jours après infection sur la variété lignée. La mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* a montré que des paramètres liés au photosystème II et à la chaîne de transport d'électrons sont des indicateurs de la santé de plante et de bons prédicteurs de l'intensité de la sporulation. L'hybride présente une altération de son horloge circadienne corrélée à une teneur en chlorophylle et une efficacité photosynthétique supérieures. L'indice de performance qui est supérieur chez l'hybride résulte d'une surexpression de certains gènes du photosystème II. La méthode que nous avons développée et appliquée, basée sur les scores de Fisher, nous a permis de sélectionner 185 gènes majoritairement associés à des mécanismes de défense chez l'hybride et à la réponse aux stress abiotiques chez la lignée. Le gène WRKY40 semble au cœur des mécanismes de résistance basale des hybrides. Nous suggérons qu'en réponse à des stress abiotiques, l'état redox global de la lignée Caturra diminue sa capacité à répondre à l'infection de la rouille. A contrario, l'hybride, dont l'état redox est plus stable, peut mettre en place des défenses basales qui limitent l'infection du pathogène.

Mots clés : *Coffea Arabica*, *Hemileia vastatrix*, Hybrides, lignée, stress abiotique et biotique, photosynthèse, cycle circadien, algorithme, gènes candidats, Quantitative Trait Transcript, WRKY 40.

Does plant health limit diseases incidence ? Study of *coffea arabica* and *Hemileia vastatrix* couple

Coffee exportation sustains the livelihood of millions of people worldwide and contributes to a large extent to the trade balance of several developing countries. The coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) is a fungus pathogen causing one of the most detrimental diseases for coffee crops. It induces severe leaf loss on coffee trees, leading to substantial yield loss. The specific resistance of modern cultivars, based on gene-for-gene resistance mechanisms, can be gradually bypassed. An alternative defence strategy involves the selection of sensitive cultivars that are vigorous enough so as to limit the disease incidence. We aim at understanding how the coffee genotypic and the environmental factors influence rust development. We have tested under controlled conditions the effect of temperature, shading, nitrogen input and hybrid vigour over rust pathogenesis. We first evaluated the importance of growing conditions and hybrid vigour over the pathogen development. Secondly, we investigated the molecular basis of hybrid vigour in the Arabica coffee tree. We then developed a novel method in order to determine a set of candidate genes that bring a higher basal resistance to hybrid cultivars. Hybrids are less sensitive to rust than inbred lines, whatever the agronomic conditions and the temperature regimes. For the inbred lines grown under a high temperature regime, high light intensity combined with low nitrogen input led to a large production of rust spores 43 days after inoculation. By measuring the fluorescence of chlorophyll *a*, we found that parameters associated to the photosystem II and to the electron transport chains were good indicators of the plant health as well as good predictors of the sporulation intensity. The hybrid cultivars showed an altered circadian clock correlated with an increased concentration of chlorophyll and a higher photosynthetic efficiency. The higher performance index in hybrid cultivars results from the over-expression of certain genes involved in the photosystem II. The method we developed, based on a Fisher combined scoring, allowed us to pinpoint 185 candidate genes. Most of these genes were associated with basal resistance mechanisms in the hybrids or with response to abiotic stress in the inbred line. The WRKY40 transcription factor gene seems at the heart of the basal resistance mechanisms for hybrid cultivars. We suggest that in response to abiotic stress, the global redox state of the Caturra line affects the plant capacity to defend itself against rust infection. In contrast, the more stable redox state of hybrid cultivars can facilitate basal defence strategies that could limit the rust spread.

Keywords: *Coffea Arabica*, *Hemileia vastatrix*, hybrids, inbred line, abiotic and biotic stress, photosynthesis, circadian clock, algorithm, candidate genes, Quantitative Trait Transcript, WRKY40